

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
«Харківський Політехнічний Інститут»

Навчально-науковий інститут хімічних технологій та інженерії

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

до лабораторних робіт з курсу
«Основи мікробіології косметичних засобів»

для студентів спеціальності
161 «Хімічні технології та інженерія»

Харків
2018

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ Й НАУКИ УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
«Харківський політехнічний інститут»

Навчально-науковий інститут хімічних технологій та інженерії

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
до лабораторних робіт з курсу
«Основи мікробіології косметичних засобів»

для студентів спеціальності
161 «Хімічні технології та інженерія»

Затверджено
вченою радою
навчально-наукового інституту
хімічних технологій та інженерії
НТУ «ХПІ»,
протокол № 5 від 27.06.2018

Харків
НТУ «ХПІ»
2018

Методичні вказівки до лабораторних робіт з курсу «Основи мікробіології косметичних засобів» для студентів спеціальності 161 «Хімічні технології та інженерія» / Укладачі: Т.О. Овсяннікова, С.В. Жирнова, А.П. Белінська, В.В. Анан'єва, О.О. Варанкіна – Харків: НТУ «ХПІ», 2018. – 49 с.

Укладачі: Т. О. Овсяннікова
 С.В. Жирнова
 А.П. Белінська
 В.В. Анан'єва
 О.О. Варанкіна

Рецензент Завідуюча лабораторії та біохімії
 Державної установи «Інститут мікробіології
 та імунології ім. І.І. Мечникова
 Національної академії медичних наук
 України», кандидат біологічних наук
 Осолодченко Т.В.

Кафедра органічного синтезу та нанотехнологій

ВСТУП

Методичні вказівки призначені для виконання лабораторних робіт з дисципліни курсу «Основи мікробіології косметичних засобів» і можуть бути використані також при оцінці мікробіологічної безпеки парфюмерії й косметичних засобів у практичній діяльності.

У методичних вказівках наведені мікробіологічні нормативи для парфюмерно-косметичної продукції, методи відбору та підготування проб для мікробіологічного аналізу, методи аналізу зразків, довідкова інформація.

Лабораторні роботи включають мету, загальні положення, порядок виконання роботи й питання для самоперевірки.

Мікробіологічному контролю підлягають засоби для догляду за шкірою особи й тіла (косметичні креми, кремоподібні маски, косметичне молочко, косметичні емульсії, шампуні, рідкі мила, гелі для душу й ванн, піни для ванн, бальзами, дезодоранти, депіляторії, засоби для й після гоління, лосьйони-тоніки, лосьйони, тоніки), засоби декоративної косметики (у т.ч. засоби для очей: рідка туш, засоби для підведення лінії ока, компактні сухі й рідкі тіні для вік, губна помада, пудра, рум'яна компактні й кремоподібні), дитяча косметика й парфюмерія, засоби для догляду за волоссям (шампуні, ополіскувачі, бальзами, маски, засоби для укладання волосся й ін.), засоби інтимної гігієни, спеціальна косметична продукція (засоби для засмаги, фотозахисні засоби й ін.), косметичні засоби разового використання (в ампулах, капсулах і ін.), запашні води.

Обов'язковому мікробіологічному контролю також підлягає сировина природного й синтетичного походження й інші компоненти, що входять до складу косметичних засобів (біологічно активні речовини – діюча речовина інгредієнти основи – структуроутворюючі емульгатори, поверхнево-активні компоненти, солюбілізатори, консерванти й ін.).

Не підлягають обов'язковому мікробіологічному контролю готові засоби, що містять більш 25 % етилового спирту, окисні фарби для волосся і нігтів.

Мікробіологічні показники безпеки парфюмерно-косметичної продукції повинні відповідати вимогам СанПіН 1.2.631-97 «Гігієнічні вимоги до виробництва й безпеки парфюмерно-косметичної продукції».

1. ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ ПРОВЕДЕННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ

Виконуючи мікробіологічні дослідження, необхідно дотримуватися наступних правил:

1. У лабораторію забороняється входити у верхньому одязі й класти на столи сумки, пакети й інші особисті речі;
2. У лабораторії дозволяється працювати тільки в халатах;
3. На кожному занятті призначаються чергові, які стежать за порядком і за виконанням кожним студентом правил роботи й поведінки в лабораторії;
4. За кожною групою студентів (3 людини) закріплюється постійне робоче місце, яке повинне втримуватися в порядку на протязі всього заняття;
5. У лабораторії категорично забороняється застосовувати їжу;
6. Не допускаються зайві ходіння, різкі рухи, сторонні розмови (особливо під час посіву мікроорганізмів);
7. Перед роботою ретельно перевіряти цілість скляного посуду, прохідність голок і надійність поршнів шприців;
8. З інфікованим матеріалом працювати тільки за допомогою інструментів (пінцети, петлі, корнцанги та ін.);
9. Забороняється доторкатися руками до досліджуваного матеріалу й конденсату в засіяних чашках;
10. При посіві матеріалу необхідно робити напис на пробірках, чашках Петри, колбах, флаконах з назвою номера аналізу (культури) і дати посіву;
11. У пробірки й чашки Петрі матеріал висівати поблизу від вогню пальника з прожарюванням бактеріологічної петлі, шпателя, країв пробірки в ході роботи над полум'ям для знезараження; предметні стекла й піпетки після роботи містяться в каструльку з дезінфікуючим розчином;
12. Під час роботи всі чашки з посівами поміщати в кювети або на підношення, пробірки – у штативи;
13. Розчини, що містять патогенні мікроорганізми, набирати піпеткою за допомогою гумового балона; не можна засмоктувати ротом або переливати розчини з посудини в посудину через край;
14. Категорично забороняється виносити мікробні культури за межі лабораторії;
15. По закінченню роботи робоче місце необхідно упорядкувати, а лотки ретельно помити з порошком або пемоксоллю до безбарвної змивної води.

У лабораторії повинна бути укомплектована аптечка для екстреної профілактики й надання медичної допомоги. В аптечці необхідно мати: етиловий спирт, настойку йоду, сухий марганцовокислий калій, перев'язні засоби, сухі навішення протарголу й азотнокислого срібла, а також необхідний набір антибіотиків.

2 ОБЛАДНАННЯ МІКРОБІОЛОГІЧНОЇ ЛАБОРАТОРІЇ

Сучасна мікробіологічна лабораторія являє собою комплекс приміщень, устаткування й приладів, що дозволяють використовувати різні прийоми для вирощування мікроорганізмів, виділення їх чистих культур, вивчення морфологічних, культуральних і фізіолого-біохімічних властивостей.

2.1 Приміщення лабораторії й необхідне встаткування

Лабораторія включає кімнати для проведення досліджень і підсобні приміщення.

Під *робочі кімнати* відводять світлі просторі приміщення, стіни яких на висоту до 170 см від підлоги офарблюють у світлі тони олійною фарбою або викладають кахельною плиткою, а підлогу покривають лінолеумом. Такого роду обробка дозволяє проводити вологе збирання із застосуванням розчинів дезінфікуючих речовин. Кімнати лабораторії повинні добре провітрюватися. У число робочих кімнат входять: бокс (для посіву мікроорганізмів), термостатна, кімната для проведення мікроскопічних і біохімічних досліджень. Бокс – спеціальне ізольоване приміщення, розділене на дві частини: робоче приміщення й передбоксник, що виключає різку циркуляцію повітря й занесення мікроорганізмів ззовні. У боксі встановлюють стіл, стільці, на стіни підвішують бактерицидні лампи на висоті 2 м від підлоги. Перед роботою приміщення боксу миють і дезінфікують, а після вологого збирання протягом 30-60 хв проводять стерилізацію повітря бактерицидними лампами. У термостатній установлюються термостати, які призначені для вирощування мікроорганізмів на живильних при середовищах постійній температурі. У лабораторії встановлюють кілька термостатів з різною температурою, сприятливої для розвитку окремих груп мікроорганізмів.

Велике значення для успішної роботи має правильна організація *робочого місця мікробіолога*. Лабораторний стіл повинен бути добре освітлений сонячним або штучним світлом. За кожною групою студентів закріплюється постійне робоче місце. Залежно від теми заняття робоче місце оснащується необхідними матеріалами й устаткуванням: спиртівкою; штативом під пробірки; бактеріологічною петлею або препарувальною голкою; набором фарб і реактивів для фарбування препаратів; мікроскопом; лотком з рейками для розміщення предметних стекол при фарбуванні препаратів; промивалкою або колбою з водою й трубкою (для промивання пофарбованих препаратів); предметними й покривними стеклами; флаконом з імерсійним маслом; фільтрувальним папером; олівцем або маркером по склу і т.д.

До *підсобних приміщень* ставляться автоклавна або стерилізаційна, мийна, приміщення для варки живильних середовищ, приміщення для зберігання посуду й живильних середовищ. У стерилізаційній установлюється паровий стерилізатор, у якому парою під тиском відбувається стерилізація живильних середовищ і лабораторного посуду. У

стерилізаційній звичайно встановлюють також сушильна шафа з терморегулятором температури від 40 до 200 °С (для сушіння й стерилізації лабораторного посуду).

2.2 Посуд для проведення мікробіологічних досліджень

Для мікробіологічних досліджень необхідний різний скляний посуд. *Чашки Петрі* (діаметр 10 см, висота 1,5 см) застосовують для виділення чистих культур, кількісного обліку мікроорганізмів, аналізу якісної сполуки мікрофлори на щільних живильних і середовищах інших досліджень; *скляні поплавці* – для вивчення процесів бродіння; *пробірки біологічні* – для зберігання чистих культур і проведення мікробіологічних досліджень; *пастеровські піпетки* з відтягнутим капіляром. Крім спеціального посуду широко використовують звичайний *хімічний посуд*: колби плоскодонні конічні Ейлермейєра, круглодонні, мірні, піпетки, градуйовані на 1 мл, піпетки Мору, мензурки, мірні циліндри, бюкси, склянки і т.д.

Колби й пробірки, які використовуються для готування й стерилізації живильних середовищ і вирощування мікроорганізмів, закривають ватно-марлевими пробками, які виготовляють вручну або за допомогою спеціальної машини. Правильно виготовлена пробка для пробірок повинна: мати довжину 3-4 см, помірковано туго входити в пробірку, бути щільної й не міняти своєї форми при багаторазовому застосуванні.

2.3 Інвентар

У мікробіологічній практиці застосовують петлі, голки, пінцети, ножиці, пластмасові й металеві штативи для пробірок, металеві лотки й ін.

Петлі й голки виготовляють із платинового, нікелевого або хромонікелевого дроту й закріплюють у металевому петлеутримувачі.

3. ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №1

МЕТОДИ ФАРБУВАННЯ БАКТЕРІЙ

Ціль роботи: Ознайомитися з методами фарбування бактерій і їх структур. Освоїти техніку фарбування бактерій по Граму.

Розрізняють прості, складні й диференціальні методи фарбування бактерій. При простому фарбуванні використовують один барвник і профарбовують усю клітку. *Складне фарбування* передбачає застосування двох або декількох барвників (наприклад, при визначенні відносини бактерій до фарбування по Граму). *Диференціальне фарбування* засноване на індивідуальному відношенні біологічних структур клітки до різних барвників (фарбування спор, оболонки, капсул, метакроматину й ін.). При цьому так

само, як і в складних методах, як правило, використовується кілька барвників.

Складні методи фарбування дозволяють розподілити бактерії на групи, що має важливе діагностичне значення при їхній ідентифікації. Серед складних методів найбільш широке застосування знайшов метод фарбування бактерій по Граму, що дозволяє розділити бактерії залежно від хімічного складу й структури клітинної стінки на дві основні групи: грампозитивні (грам+; Gr^+) і грамнегативні (грам–; Gr^-). Грампозитивні бактерії по цьому методу офарблюються в синьо-фіолетовий колір, а грамнегативні – у рожевий. До складних методів відноситься й метод фарбування по Цилію-Нільсену, що дозволяє диференціювати бактерії на дві групи по кислотостійкості. Цей метод дозволяє виявити туберкульозну паличку, бактерії паратуберкульозного ентериту великої рогатої худоби й інші кислотостійкі мікроорганізми.

При використанні *диференціальних (спеціальних) методів* можна офарбити спори, визначити наявність у клітинах запасних живильних речовин, виявити клітинні структури.

3.1 Фарбування бактерій по методу Грама

Сутність методу полягає у відмінності хімічного складу й будови клітинної стінки грампозитивних і грамнегативних бактерій.

Клітинна стінка Gr^+ бактерій товста, але одношарова, містить багато пептидоглікану – муреїну, а також тейхоеві кислоти, які утворюють міцну сполуку з барвниками – генціанвіолетом і йодом і тому залишаються пофарбованими після обробки мазка спиртом. Таким чином, Gr^+ бактерії по методу Грама офарблюються в синьо-фіолетовий колір.

У Gr^- бактерій клітинна стінка тонка, але двошарова. Муреїну мало, причому він утримується у внутрішньому шарі клітинної стінки, тейхоеві кислоти відсутні. Зовнішній шар клітинної стінки містить, головним чином, речовини, що володіють гідрофобними властивостями – ліпополісахаридами й ліпопротеїдами. Ці речовини не утворюють міцного комплексу з фарбами генціанвіолетом і йодом і тому клітки знебарвлюються після обробки 96 %-м етиловим спиртом і після додаткового фарбування барвником фуксином офарблюються в блідо-рожевий колір.

Техніка фарбування по Граму

1. На предметному склі готують фіксований мазок досліджуваної чистої культури;

2. Мазок офарблюють барвником генціанвіолетом через смужку фільтрувального паперу. Можна також використовувати заздалегідь приготовлені фільтрувальні папірці, змочені 1 %-м спиртовим розчином кристалвіолету й висушені (метод Грама в модифікації А.В. Синева). У цьому випадку папірці поміщають на фіксований мазок і змочують

декількома краплями води. Фарбування препарату проводять протягом 2-3 хвилин;

3. Фільтрувальний папір знімають із мазка, фарбу зливають і наносять на мазок розчин Люголю на 2 хвилини;

4. Розчин Люголю зливають із мазка й обробляють 96 %-м спиртом протягом 30-60 сек. Потім препарат промивають водою й підсушують фільтрувальним папером;

5. Мазок офарблюють барвником фуксином 2-3 хвилини, другий раз промивають водою й підсушують фільтрувальним папером.

Потім на скло наносять краплю імерсійної олії й розглядають препарат з об'єктивом x90 або x100 при максимальному висвітленні.

Контрольні запитання:

1. Які існують методи фарбування бактерій?
2. Яке призначення складних методів фарбування бактерій? Навести приклади складних методів фарбування?
3. Для чого використовуються диференційні (спеціальні) методи фарбування бактерій? Навести приклади.
4. У чому полягає сутність методу фарбування по Граму?
5. Яким чином проводять фарбування по методу Грама?

4. ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №2

ЖИВИЛЬНІ СЕРЕДОВИЩА

Ціль роботи: Ознайомитися з вимогами, пропонованими до живильних середовищ, з різними класифікаціями й хімічним складом живильних середовищ, правилами їх готування й метою використання.

Різноманітні харчові речовини, яких потребують мікроорганізми і які використовуються ними для синтезу основних компонентів клітини, росту, розмноження й для одержання енергії називаються живильними речовинами, а середовище, що містить живильні речовини, є живильним середовищем.

4.1 Вимоги, які висуваються до живильних середовищ:

1. У середовищі повинні бути всі необхідні для росту й розвитку мікроорганізмів хімічні елементи;
2. Середовище повинна бути збалансована по хімічному складу.
3. Середовища повинні мати достатню вологість, що забезпечує можливість дифузії живильних речовин у клітку. Для грибів ця вологість забезпечується змістом вологи в субстраті не менш 12 %, для бактерій – не менш 20 %.
4. Середовище повинна мати певне значення рН середовища. Серед мікроорганізмів розрізняють ацидофіли (мікроорганізми, що люблять

кислоту), алкалофіли (мікроорганізми, що люблять луг), і нейтрофіли (найкраще ростуть у нейтральному середовищі із рН близько 7,0). До ацидофілів відносяться гриби й дріжджі. Більшість бактерій – нейтрофіли, для яких активна кислотність середовища близько 4 од. рН є згубною. Слід пам'ятати, що при стерилізації середовища й у процесі культивування мікроорганізмів, кислотність середовища може сильно змінюватися. Щоб уникнути зміни рН у середовище додають буферні системи (наприклад: фосфатний буфер), CaCO_3 (для нейтралізації органічних кислот, що утворюються в результаті культивування), речовини органічної природи, що володіють буферними властивостями (наприклад: амінокислоти, поліпептиди, білки) і ін.;

5. Середовища повинні бути ізотонічними для мікробної клітки, тобто осмотичний тиск у середовищі повинне бути таким же, як усередині клітки.

6. Середовища повинні мати певний окисно-відновний потенціал (r_{h_2}), що визначають насичення їх киснем. Оцінка проводиться за шкалою індексів від 0 до 41, цим індексом можна позначити будь-який ступінь аеробності: насичений киснем розчин позначають $r_{h_2}=41$, насичений воднем $r_{h_2}=0$. Облігатні анаероби розмножуються при r_{h_2} не вище 5, аероби – не нижче 10.

7. Середовища повинні бути стерильними, що забезпечує ріст чистих культур мікроорганізмів.

4.2 Класифікація живильних середовищ

За *консистенцією* живильні середовища діляться на рідкі, щільні й сипучі.

Рідкі середовища застосовуються для накопичення біомаси або продуктів обміну мікроорганізмів, для відновлення культур, що довго зберігаються, для підтримки й зберігання тих чистих культур, які погано ростуть на щільних середовищах.

Щільні середовища необхідні для виділення й опису культуральних властивостей чистих культур мікроорганізмів, тому що на них можна одержати ізольовані колонії (колонія – популяція мікроорганізмів, що вирости з однієї клітини). Щільні живильні середовища використовуються також для кількісного обліку мікроорганізмів у харчових продуктах, інших об'єктах зовнішнього середовища й для зберігання чистих культур.

Щільні середовища готуються з рідких шляхом додавання гелеутворюючих речовин: агар-агару, желатину, гелю кремнекислого (силікагелю).

Кращою гелеутворюючою речовиною є агар-агар, який одержують з водоростей. Це складний полісахарид, який утворює гель із крапкою плавлення 96-100 °С и температурою застигання близько 40 °С. Тому на агаризованих середовищах можна культивувати майже всі мікроорганізми. Крім того, агар-агар дуже рідко використовується мікроорганізмами в якості живильного субстрату. Для ущільнення рідкого середовища в нього вносять залежно від ступеня очищення від 1,5 до 2,5 % агар-агару.

На відміну від агар-агару желатин – це речовина білкової природи, яка виходить із костей і хрящів тварин при виварюванні, тому багато мікроорганізмів використовують желатин як живильний субстрат і до кінця культивування середовище з желатином розріджується. Обмежене використання желатину як ущільнювача для щільних живильних середовищ зв'язане також з тим, що в порівнянні з агар-агаром він утворює менш міцний гель, який плавиться при 23-25 °С і застигає при 20 °С, у той час як більшість мікроорганізмів розвиваються при температурі від 25 до 37 °С.

Якщо потрібно одержати щільні середовища, що не містять органічних компонентів, або синтетичні середовища з певною кількісною і якісною сполукою, то в якості ущільнювача застосовують гель кремнекислий. Одержують його шляхом змішування рівних об'ємів соляної кислоти з питомою масою 1,1 і рідкого скла (Na_2SiO_3 або K_2SiO_3) з наступним розливанням по 25-30 см³ у чашки Петрі й витримкою 1-2 год.

Сипучі середовища застосовують в основному в промисловій мікробіології. До таких середовищ відносять розварене пшона, відрубай, кварцовий пісок, змочений живильним розчином. Такі середовища використовуються для культивування аеробних мікроорганізмів.

По походженню й складу живильні середовища діляться на натуральні (природні), синтетичні (штучні) і напівсинтетичні.

Натуральні середовища готуються із продуктів тваринного й рослинного походження. Вони містять усі інгредієнти, необхідні для росту й розвитку мікроорганізмів. Основним недоліком цих середовищ є те, що вони мають складний й непостійний склад. Натуральні середовища використовують для вирощування мікроорганізмів, накопичення біомаси, зберігання чистих культур, але вони мало придатні для вивчення обмінних процесів мікроорганізмів. Такими середовищами є відвари злаків, трав, овочеві й фруктові соки, різні екстракти, м'ясний бульйон, автолізат дріжджів, молоко, молочна сироватка, гідролізати з рослинної сировини і т.д. Найбільше часто застосовуваними натуральними живильними середовищами являються м'ясо пептонний агар (МПА) і м'ясопептонний бульйон (МПБ), призначені для культивування бактерій, а також пивне сусло, що не охмелене, й сусло-агар. Такі середовища використовують для вирощування й накопичення біомаси грибів і дріжджів.

Синтетичні середовища мають у своєму складі хімічно чисті органічні й неорганічні сполуки в строго зазначених концентраціях. По набору компонентів синтетичні живильні середовища можуть бути складними (середовища для вирощування молочнокислих бактерій) і досить простими. Такі середовища застосовуються для дослідження обміну речовин, з'ясування закономірностей росту або біосинтезу якого-небудь метаболіту і т.д. Найбільше часто в практичній роботі використовують синтетичне середовище Чапека для вирощування грибів і середовище Рідера для дріжджів. Склад цих середовищ наведено в додатку. Основним недоліком

синтетичних середовищ є те, що на таких середовищах мікроорганізми дуже довго ростуть.

Напівсинтетичні середовища у своєму складі містять хімічно чисті органічні й неорганічні речовини, (як і в синтетичних середовищах) і речовини рослинного або тваринного походження як факторів росту для прискорення росту й розвитку мікроорганізмів. Ціль використання напівсинтетичних середовищ та ж, що й синтетичних. Тому що натуральні компоненти вносяться в невеликих кількостях, те їх хімічний склад не враховується при вивченні обмінних процесів тих або інших мікроорганізмів.

По *призначенню* середовища діляться на універсальні (основні), виборчі (накопичувальні, елективні) і диференційно-діагностичні.

Універсальні середовища використовуються для вирощування багатьох видів мікроорганізмів. До універсальних середовищ, використовуваних для вирощування бактерій, відносяться м'ясопептоний агар і бульйон (МПА, МПБ), середовище для визначення кількості мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів (середовище для визначення КМАФАнМ). Гриби й дріжджі добре ростуть на пивному суслі, що не охмелене, сусло-агарі (СА), середовищі Сабура.

Виборчі середовища забезпечують розвиток тільки певних мікроорганізмів або групи родинних видів і непридатні для росту інших. У такі середовища, як правило, додають речовини, що вибірково пригнічують розвиток супутньої мікрофлори. Виборчі середовища застосовують для виділення певних мікроорганізмів з місць їх природнього проживання й для одержання накопичувальних культур. У якості накопичувальних живильних використовують, наприклад рідкі середовища Кесслера (використовується для накопичення бактерій групи кишкової палички), Мюллера й Кауфмана (для виявлення сальмонел). Елективними середовищами можуть бути щільні живильні середовища, такі як молочно-сольовий агар (МСА) і жовтково-сольовий агар (ЖСА) – для виявлення й кількісного обліку в продуктах коагулазопозитивних стафілококів, кров'яний агар – для виявлення гемолітичних стрептококів.

Диференційно-діагностичні середовища використовуються для визначення видової приналежності досліджуваного мікроба, ґрунтуючись на особливостях його обміну речовин. Склад цих середовищ дозволяє чітко виділити найбільш характерні властивості досліджуваного мікроорганізму. Прикладом таких середовищ є щільне середовище Ендо, яке застосовується для визначення бактерій групи кишкової палички, до складу якої входить лактоза, насичений спиртової розчин фуксину, знебарвленого перед додаванням у середовище 10 %-им водяним розчином сульфату натрію (утворюється безбарвна фуксин-сірчиста кислота). Кишкова паличка на такому середовищі ферментує лактозу з утвором альдегідів, внаслідок чого безбарвна фуксин-сірчиста кислота переходить у фуксин-сірчисту сполуку з утвором фуксину, який офарблює колонії кишкової палички в червоний колір з металевим блиском.

4.3 Готування живильних середовищ із сухих середовищ, які випускаються промисловістю

Полягає в розчиненні певного кількості порошку у воді, доведення отриманої суміші до кипіння й кип'ятінні протягом 5 хвилин. Далі (при необхідності) середовище фільтрується через ватно-марлевий фільтр і розливається в пробірки або колби, які закриваються ватно-марлевими пробками. Далі середовища стерилізують в автоклаві. З використанням сухих середовищ готують м'ясопептонний бульйон (МПБ), м'ясопептонний агар (МПА), середовище Сабуро, середовище Кесслера, середовище для визначення мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів (середовище для визначення КМАФАнМ), середовище Ендо й ін.

4.4 Готування живильних із середовищ окремих компонентів

Проводиться по методиках, описаних у додатку даних методичних вказівок для лабораторних робіт.

Контрольні запитання:

1. Які вимоги висуваються до живильних середовищ?
2. Які існують живильні середовища за консистенцією?
3. За допомогою яких речовин готуються щільні середовища з рідких середовищ?
4. Чому обмежене використання желатину як ущільнювача для щільних живильних середовищ?
5. Які існують живильні середовища за походженням й складом?
6. Які існують живильні середовища за призначенням?
7. Яка функція диференційно-діагностичних середовищ? Наведіть приклади.
8. Яким чином готують живильні середовища із сухих середовищ, які випускаються промисловістю?

5. ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №3

КУЛЬТИВУВАННЯ. ОТРИМАННЯ ЧИСТИХ І НАКОПИЧУВАЛЬНИХ КУЛЬТУР МІКРООРГАНІЗМІВ

Ціль роботи: Ознайомитися з поняттями про чисту й накопичувальну культуру мікроорганізмів, з методами виділення накопичувальних і чистих культур мікроорганізмів, провести механічний поділ мікроорганізмів з використанням щільних живильних середовищ методом Коха та методом Дригальського.

5.1 Поняття про чисту та накопичувальну культуру мікроорганізмів

Культивування – вирощування мікроорганізмів на живильних середовищах. При культивуванні на живильних середовищах виростають *культури* мікроорганізмів. *Ріст культури* – фізіологічний процес, у результаті якого збільшується *біомаса* – маса клітинної речовини даного мікроорганізму.

Чистою культурою мікроорганізму називають культуру мікроорганізмів одного виду, представлену потомством однієї клітки. Для виділення чистої культури використовують, як правило, щільні живильні, середовища на яких кожна клітка виростає у вигляді *ізолюваної колонії* – потомства мікроорганізмів, що утворювалося з однієї клітки.

Виділення чистої культури мікроба є основою бактеріологічної роботи, тому що найчастіше досліджуваний матеріал містить суміш різних видів мікробів. Чисті культури потрібні для вивчення властивостей мікроорганізмів і встановлення їх видової приналежності. Крім того, чисті культури мікроорганізмів (дріжджів, мікроскопічних грибів, молочнокислих, оцтовокислих, пропіонововокислих і інших бактерій) мають промислово цінні властивості й потрібні для одержання різних продуктів і речовин, які знайшли застосування в харчовій промисловості й інших галузях народного господарства.

Перед виділенням чистої культури з різних об'єктів навколишнього середовища (косметичних засобів, харчового продукту, з поверхні плодів і овочів, із ґрунту, води й ін.), у яких перебуває безліч мікроорганізмів, спочатку одержують накопичувальні культури, проводячи культивування в *елективних умовах* – умовах, що сприяють розвитку однієї культури й обмежуючих розвиток супутніх мікроорганізмів. Забезпечити елективні умови для мікроорганізмів можна тільки в тому випадку, якщо відомі особливості обміну речовин виділюваного мікроорганізму. Тому що різні мікроорганізми використовують різні джерела харчування, то елективні умови легше всього забезпечити, підбираючи певні сполуки живильних середовищ. Можна створити елективні умови, забезпечуючи відповідну температуру, рН, освітлення й ін.

Накопичувальні культури складаються переважно із клітин мікроорганізмів одного виду. Для одержання накопичувальних культур використовують рідкі накопичувальні живильні середовища, різні методи обробки матеріалу, що містить суміш мікробів, а також ураховують інші особливості виділюваних з об'єкта мікроорганізмів.

Для виділення чистих і накопичувальних культур з різних об'єктів у лабораторіях використовують методи посіву й пересівання. *Посівом* називається внесення частини досліджуваного матеріалу в стерильне живильне середовище, *пересіванням* – перенос частини вирослої на живильному середовищі культури мікроорганізмів на інше свіже живильне середовище.

5.2 Методи виділення накопичувальних культур мікроорганізмів

До таких методів відносяться методи збагачення, метод нагрівання досліджуваного матеріалу для виділення спороутворюючих бактерій, метод виділення рухливих форм бактерій (метод Шукевича) і ін.

5.2.1 Методи збагачення

Їх часто застосовують для виділення чистих культур мікроорганізмів (наприклад, бактерій групи кишкової палички (БГКП), сальмонел і ін.) з матеріалів, у яких мало виділюваних мікроорганізмів, але втримується велика кількість супутньої мікрофлори. Для збільшення чисельності виділюваного виду мікроорганізмів спочатку роблять посів досліджуваного матеріалу в накопичувальні живильні середовища, які містять речовини, що стимулюють його ріст і гнітючі або затримуючі розмноження супутньої мікрофлори. Наприклад, для виділення сальмонел проводять посів у середовища збагачення Кауфмана, Мюллера й ін., для виділення БГКП – на середовище Кесслера.

5.2.1.1 Метод нагрівання

Застосовують для виділення чистих культур спорових форм бактерій (бацил, клостридій). У цьому випадку перед посівом досліджуваний матеріал прогрівують на водяній лазні при температурі 75-85 °С протягом 20-30 хв. Вегетативні форми гинуть під час прогрівання, а спори мікробів залишаються живими, й при наступних висівах на щільне середовище проростають, формуючи колонії.

5.2.1.2 Метод виділення рухливих форм бактерій (метод Шукевича)

Полягає в посіві досліджуваного матеріалу в конденсаційну воду скошеного м'ясопептонного агару. При розмноженні рухливі форми мікроорганізмів з конденсаційної води поширюються на агарі, як би вповзаючи на його поверхню.

5.2.1.3 Методи виділення анаеробних мікроорганізмів

Засновані на вирощуванні мікроорганізмів у середовищах з низькою концентрацією кисню або в безкисневому середовищі, що досягається:

- посівом досліджуваного матеріалу в середовища, що містять, редукуючи й легко окиснювані речовини. У якості таких речовин найчастіше використовують тіогліколят натрію, солянокислий цистеїн, шматочки тваринних і рослинних тканин;
- посівом досліджуваного матеріалу в глибину щільних живильних середовищ. Посів робиться уколом препарувальної голкою в пробірку зі стовпчиком щільного середовища або в розплавлене щільне або напіврідке живильне середовище із наступним перемішуванням;
- механічним видаленням повітря з посудин при вирощуванні анаеробних мікроорганізмів (створюють вакуум);

- культивуванням анаеробних мікроорганізмів у рідких середовищах під шаром масла;
- культивуванням анаеробних мікроорганізмів в атмосфері інертного газу, диоксиду вуглецю, азоту.

5.3 Методи виділення чистих культур мікроорганізмів

5.3.1 Метод Пастера (метод граничних розведень)

Полягає в тому, що з досліджуваного матеріалу роблять ряд послідовних розведень у рідкому живильному середовищі. Для цього краплю посівного матеріалу вносять у пробірку зі стерильним рідким середовищем, з неї краплю переносять у наступну пробірку й так засівають до 8-10 пробірок. З кожним розведенням кількість мікробних кліток, що попадають у середовище, буде зменшуватися й можна одержати таке розведення, у якому у всій пробірці із середовищем буде перебувати тільки одна мікробна клітина, з якої розів'ється чиста культура мікроорганізму. Тому що в рідких середовищах мікроби ростуть дифузно, тобто легко розподіляються у всьому середовищі, то ізолювати одну мікробну клітину від іншої важко.

Таким чином, метод Пастера не завжди забезпечує одержання чистої культури. Тому цей метод використовується, головним чином, для попереднього зменшення концентрації мікроорганізмів у матеріалі перед посівом його в щільне середовище для одержання ізольованих колоній.

5.3.2 Методи механічного поділу мікроорганізмів з використанням щільних живильних середовищ

До таких методів відносяться метод Коха й метод Дригальського.

5.3.2.1 Метод Коха (метод глибинного посіву)

Досліджуваний матеріал вносять бактеріологічною петлею або пастерівською піпеткою в пробірку з розплавленим щільним живильним середовищем. Рівномірно розмішують уміст пробірки, обертаючи її між долонями. Краплю розведеного матеріалу переносять у другу пробірку, із другої – у третю і т.д. Уміст кожної пробірки, починаючи з першої, виливають у стерильні чашки Петрі. Після застигання середовища в чашках, їх поміщають у термостат для культивування.

Для виділення анаеробних мікроорганізмів по методу Коха необхідно обмежити доступ кисню до культури. Із цією метою поверхню глибинного посіву в чашці Петрі заливають стерильною сумішшю парафіну й вазеліну (1:1). Можна також залишати посівний матеріал, ретельно перемішаний з агаризованим середовищем, безпосередньо в пробірці. Ватяну пробку при цьому заміняють гумовою або заливають поверхню агару сумішшю парафіну й вазелінового масла. Щоб витягти вирості колонії анаеробних мікроорганізмів, пробірки злегка нагрівають, швидко обертаючи над полум'ям пальника. Агар, що прилягає до стінок, розплавляється, і стовпчик легко вислизає в підготовлену чашку Петрі. Далі стовпчик з агаром

розрізають стерильним скальпелем, колонії витягають стерильною петлею й переносять у рідке середовище.

5.3.2.2 Метод Дригальського

Цей метод заснований на механічному поділі мікробних клітин на поверхні щільного живильного середовища в чашках Петрі. Кожна мікробна клітина, фіксуючись у певному місці, починає розмножуватися, утворюючи колонію.

Для посіву по методу Дригальського використовують кілька чашок Петрі, залитих щільним живильним середовищем. На поверхню середовища вносять краплю досліджуваного матеріалу. Потім за допомогою стерильного шпателя цю краплю розподіляють по всій поверхні живильного середовища (посів газonom).

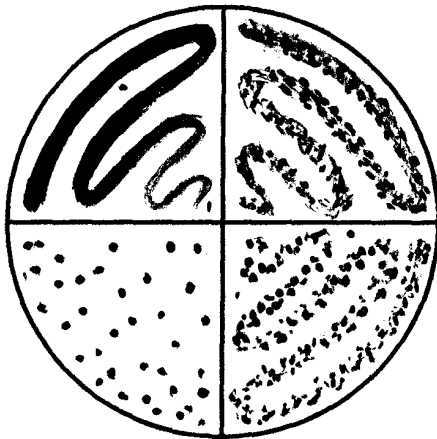


Рис. 1 Механічний поділ мікроорганізмів з використанням щільних живильних середовищ

Посів також можна проводити штрихом, за допомогою бактеріологічної петлі. Цим же шпателем або петлею здійснюють посів у другу, третю і т.д. чашки. Як правило, у першій чашці після культивування посіву з'являється ріст мікробів у вигляді суцільного нальоту, у наступних чашках ріст мікроорганізмів знижується й утворюються ізольовані колонії, з яких відсіванням можна легко виділити чисту культуру.

Таким чином, у перших секторах виходить суцільний ріст, а уздовж наступних штрихів виростуть відособлені колонії, що представляють собою потомство однієї клітки.

З метою економії середовищ і посуду можна користуватися однією чашкою, розділивши її на сектори, і послідовно засівати їх штрихом (метод штриха, що виснажує). Для цього матеріал беруть петлею й проводять нею ряд паралельних штрихів спочатку по поверхні першого сектору, а клітинами, що потім послідовно залишилися на петлі, засівають усі інші сектори. При кожному наступному штриху відбувається зменшення кількості кліток, що засіваються.

5.3.2.3 Метод виділення чистих культур за допомогою хімічних речовин використовується при ізолюванні культур мікроорганізмів, стійких до певних хімічних речовин. Наприклад, за допомогою цього методу можна виділити чисту культуру туберкульозних мікобактерій, стійких до дії кислот,

лугів і спирту. У цьому випадку досліджуваний матеріал перед посівом заливають 15 % розчином кислоти або антиформіном і витримують у термостаті протягом 3-4 годин. Після впливу кислоти або луку клітини туберкульозної палички залишаються живими, а всі інші мікроорганізми, що втримуються в досліджуваному матеріалі, гинуть. Після нейтралізації кислоти або луку оброблений матеріал висівають на щільне середовище й одержують ізольовані колонії збудника туберкульозу.

5.3.2.4 Біологічні методи виділення чистих культур патогенних мікроорганізмів засновані на зараженні досліджуваним матеріалом лабораторних тварин, сприйнятливих до даного виду збудника. Якщо патогенний мікроорганізм утримується в досліджуваному об'єкті, то лабораторна тварина занеджує й гине. Після розкриття полеглої тварини із внутрішніх органів роблять посіви на спеціальні середовища, на яких виростають чисті культури виділюваних мікробів.

Контрольні запитання:

1. Що таке культивування мікроорганізмів?
2. Для чого виділяють чисту культуру мікроорганізмів?
3. Що таке накопичувальні культури мікроорганізмів?
4. Які існують методи виділення накопичувальних культур мікроорганізмів?
5. Які особливості виділення анаеробних мікроорганізмів?
6. Які існують методи виділення чистих культур мікроорганізмів?
7. Яким чином проводять механічний поділ мікроорганізмів з використанням щільних живильних середовищ?
8. У яких випадках застосовуються методи виділення чистих культур за допомогою хімічних речовин?
9. В чому полягають біологічні методи виділення чистих культур патогенних мікроорганізмів?

6. ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №4

ТЕХНІКА ПОСІВУ Й ПЕРЕСІВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ НА ЖИВИЛЬНІ СЕРЕДОВИЩА

Ціль роботи: Освоїти техніку посіву мікроорганізмів на щільні й рідкі живильні середовища, методики виділення чистих і накопичувальних культур з різних об'єктів навколишнього середовища

Посіви й пересівання мікроорганізмів на живильні проводять середовища близько полум'я пальника (але не в полум'ї), по можливості швидко, щоб не забруднити культури сторонніми мікроорганізмами. Не

можна робити різких рухів, ходити, кашляти й т.п. близько працюючого із чистою культурою, тому що рух повітря збільшує небезпеку випадкового зараження культури й середовища. Тому посіви й пересівання мікроорганізмів слід проводити в боксі.

6.1 Посів на щільні середовища в чашки Петрі

Посів у чашки Петрі роблять у такий спосіб: щільне живильне середовище в пробірках або колбах розплавляють на киплячій водяній лазні, прохолоджують до 48-50 °С та, дотримуючи правил асептики, розливають рівним шаром товщиною 3-5 мм у стерильні чашки (рис. 2). Посів роблять скляним шпателем Дригальського (рис. 3) або петлею у вигляді паралельних або зигзагоподібних (метод посіву, що виснажує) штрихів.

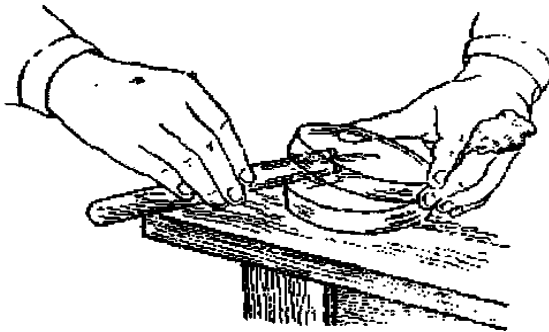


Рис. 2 Правила розливання живильного середовища в чашки Петрі

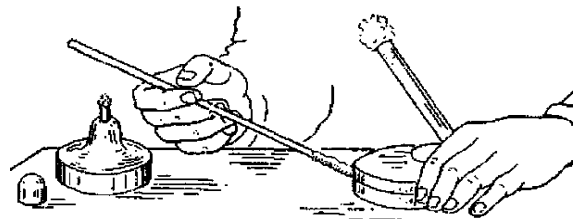


Рис. 3 Посів на агар у чашки Петрі шпателем Дригальського

6.2 Посів у рідке живильне середовище

Посів у рідке середовище можна робити бактеріологічною петлею або піпеткою поблизу полум'я пальника. Обидві пробірки тримають у злегка похилому положенні, щоб не замочити ватно-марлеві пробки. Петлю з мікробним матеріалом опускають безпосередньо в стерильне середовище й обполіскують. При внесенні кліток, узятих петлею із щільного середовища, матеріал ретельно розтирають по стінці пробірки у верхнього краю рідкого середовища, увесь час змиваючи його середовищем.

6.3 Пересівання на щільні живильні середовища в пробірках

Техніка посіву по етапах показана на рисунку 4.

1. Пробірки з культурою й живильним середовищем поміщають на два пальці лівої руки в похилому положенні. У правій руці великим і вказівним пальцем тримають бактеріальну петлю й стерилізують у полум'ї пальника;

2. Виймають ватяні пробки з обох пробірок, притискають їх до долоні мізинцем і підмізинним пальцями правої руки й обпалюють краю пробірок. Стежать за тим, щоб пробки не стосувалися сторонніх предметів;

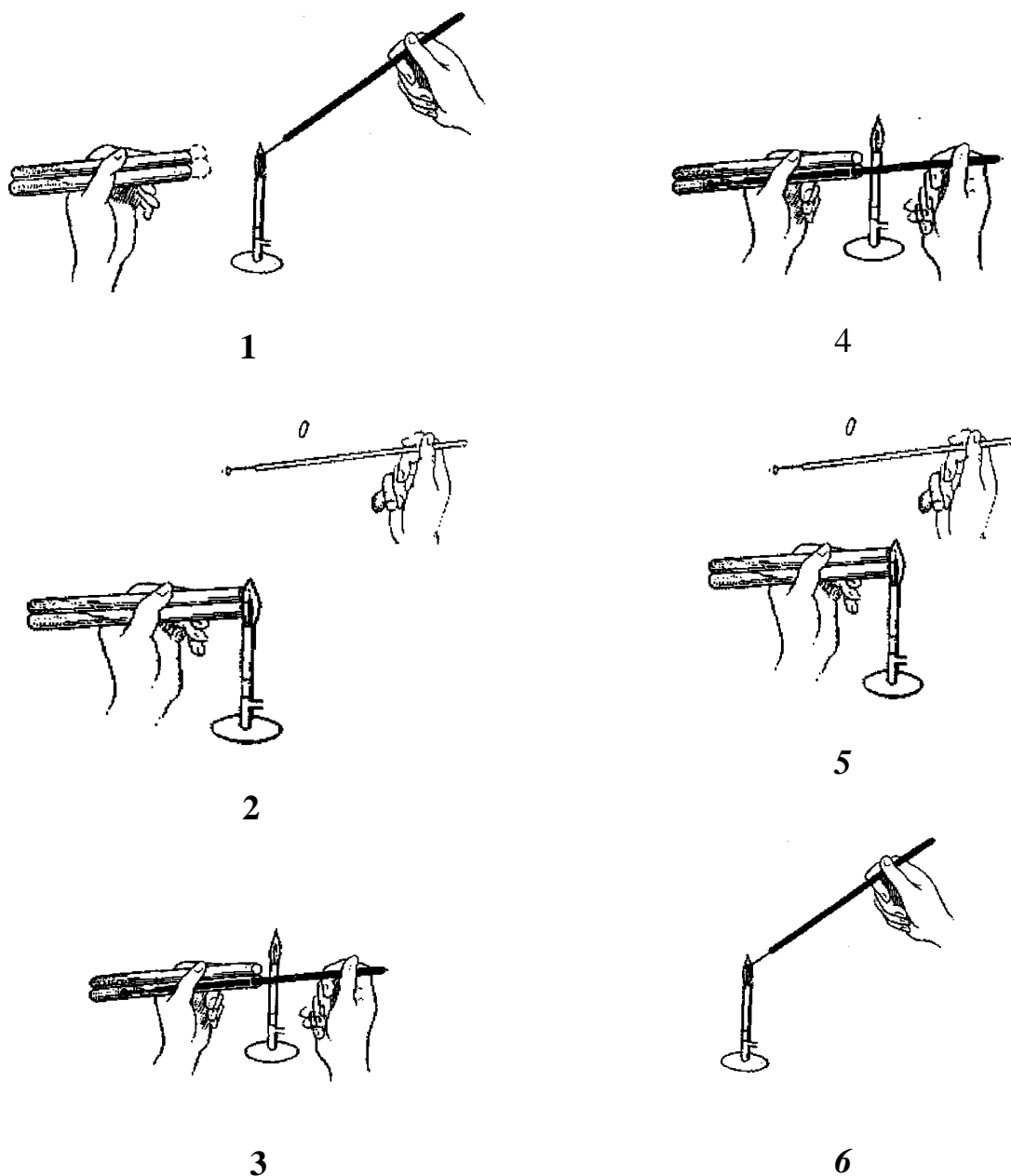


Рис. 4 Пересівання культури мікроорганізмів у пробірки

3. Петлю вводять у пробірку з мікробною культурою, що пересівається. Обережно, не стосуючись стінок, відбирають краплю рідкої культури. Якщо роблять пересівання з косого шару агару, то для охолодження петлі спочатку слід доторкнутися до поверхні агару, де немає культури, після чого беруть невелика кількість мікробної маси зі скошеного живильного середовища;

4. Уводять петлю з матеріалом у пробірку зі стерильним рідким середовищем, намагаючись не зачіпати стінок пробірки. При посіві на скошені живильні середовища із клітками мікроорганізмів петлю опускають майже до дна, де накопичується невелика кількість конденсаційної води. Злегка стосуючись петлею поверхні щільного середовища, але не розпушуючи її, проводять від дна нагору штрих;

5. Петлю виймають, обпалюють краю пробірок і внутрішні кінці пробок, після чого пробірки закривають;

6. Петлю знову прожарюють у полум'ї пальника.

Контрольні запитання:

1. Яким чином проводять посів мікроорганізмів на щільні середовища в чашки Петрі?

2. Яким чином проводять посів мікроорганізмів у рідке живильне середовище?

3. Як проводять пересівання мікроорганізмів на щільні живильні середовища в пробірках?

7. ЛАБОРТОРНА РОБОТА №5

СХЕМА РОЗВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖУВАНОГО ПРОДУКТУ ТА ПРОВЕДЕННЯ МІКРОБІОЛОГІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ

Ціль роботи: ознайомлення з методикою приготування розведення аналізованого засобу, проведення посівів цих розведень на щільні й рідкі живильні середовища для визначення мікробіологічних показників.

7.1 Готування розведень досліджуваного продукту

Для готування розведень використовують пробірки з 9 см³ стерильної води. Іноді для готування розведень використовуються стерильні розчини розведеного фосфатного буферу, ізотонічного розчину хлориду натрію, пептонної води або лимоннокислого натрію. У першу пробірку стерильною піпеткою вносять 1 см³ продукту. Новою стерильною піпеткою ретельно перемішують уміст пробірки (розведення 1:10). Потім цією ж піпеткою із пробірки з розведенням 1:10 відбирають 1 см³ рідини й переносять у другу пробірку з водою (розведення 1:100) (рис. 5).

Кількість розведень розраховують так, щоб у чашках Петрі виросло від 30 до 300 колоній.

Рекомендації при готуванні I розведення (1:10):

- з косметичних засобів, які мають у своєму складі рослинні або тваринні олії:

1 г досліджуваного продукту (крему) зважують із дотриманням правил асептики й вносять у пробірку з 9 см³ води. Потім пробірку поміщають у водяну лазню з температурою 50-55 °С. Витримують пробірку на водяній лазні до повного розплавлювання крему. Уміст пробірки ретельно перемішують і для наступних розведень відбирають 1 см³ рідини, що перебуває під шаром олії;

- із косметичних засобів, що мають щільну або неоднорідну консистенцію:

1 г середньої проби досліджуваного продукту зважують із дотриманням правил асептики, поміщають у стерильну ступку. У ступку також вносять 9 см³ стерильної води, потім увесь матеріал розтирають із піском протягом 10-15 хв поблизу полум'я пальника до одержання однорідної маси. Далі дають суспензіям осісти й відбирають 1 см³ надосадової рідини для готування розведення 1:100.

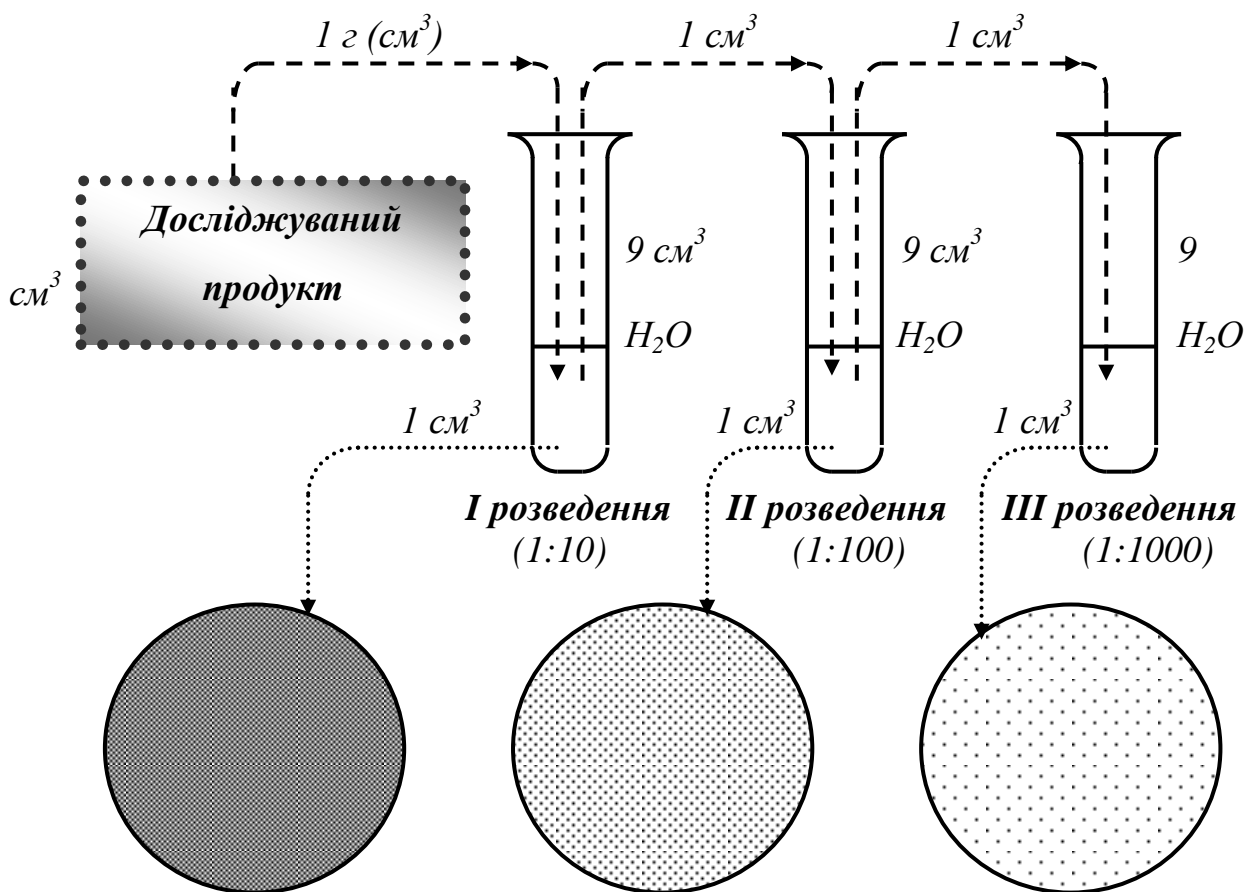


Рис. 5 Схема виготовлення розведення продукту та посіву його в чашки Петрі

7.2 Чашкові методи кількісного обліку мікроорганізмів

Сутність чашкових методів кількісного обліку мікроорганізмів полягає в посіві розведень продукту на стерильні щільні живильні середовища в чашки Петрі з наступним культивуванням і підрахунком вирослих у чашках колоній. При цьому вважається, що кожна колонія є результатом розмноження однієї клітки.

Облік результатів при використанні чашкових методів

Кількість вирослих колоній підраховують у кожній чашці, помістивши її нагору дном на темному тлі, користуючись лупою зі збільшенням від 4 до 10

раз. При великій кількості колоній і рівномірному їхньому розподілі дно чашки ділять на сектори, підраховують число колоній в 2-3 секторах, знаходять середньоарифметичне число колоній і множать на розведення (10 – при першому розведенні продукту, 100 – при другому розведенні і т.д.).

Якщо чашки з першим розведенням (1:10) не містять колоній, то результат виражають так: менше 1×10 КУО/см³ (КУО – колонієутворюючі одиниці);

Якщо в чашках Петрі з I розведенням (1:10) знаходиться менше, чим 15 колоній, то результат виражається так: кількість мікроорганізмів менш $M \times 10$ КУО/г, де М – число вирослих колоній;

Якщо кількість колоній більш 15, то підраховують кількість колоній у чашках, множать на розведення й отриманий результат округляють відповідно:

- до числа, кратного 5, якщо кількість колоній у чашці менш 100;
- до числа, кратного 10, якщо кількість колоній у чашці більш 100.

Приклад: Посіяне I розведення продукту 1:10. У чашці Петрі виросло 194 колонії. Отриманий результат округляємо до 200.

Кількість мікроорганізмів у продукті: $200 \times 10 = 2,0 \times 10^3$ КУО/г.

Чашковими методами визначають наступні мікробіологічні показники: КМАФАнМ, кількість спор грибів і дріжджів, вміст гнильних бактерій, коагулазопозитивних стафілококів.

7.3 Методи, які засновані на накопиченні мікроорганізмів з їх наступною ідентифікацією

Ці методи використовуються для виявлення мікроорганізмів, вміст яких незначний у порівнянні із загальною кількістю мікроорганізмів.

Сутність цих методів полягає в посіві продукту або його розведень на накопичувальні рідкі середовища. Якщо після культивування виявляють ріст мікроорганізмів (утвір осаду, помутніння середовища, накопичення газу в поплавцях), то надалі проводять пересівання із пробірок, у яких замічений ріст на диференційно-діагностичні середовища для ідентифікації вирослих на накопичувальному середовищі мікроорганізмів.

До таких методів відносять визначення наявності БГКП, сальмонел.

Контрольні запитання:

1. Як готуються розведення досліджуваних продуктів?
2. У чому полягає сутність чашкових методів кількісного обліку мікроорганізмів?
3. Як проводиться облік результатів при використанні чашкових методів?
4. В чому сутність методів, які засновані на накопиченні мікроорганізмів з їх наступною ідентифікацією?

8. ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №6

МЕТОДИ ВІДБОРУ Й ПІДГОТОВКИ ПРОБ ПАРФУМЕРНО-КОСМЕТИЧНИХ ВИРОБІВ ДЛЯ МІКРОБІОЛОГІЧНОГО АНАЛІЗУ

Ціль роботи: Ознайомитися з вимогами, пропонованими до добору проб парфумерно-косметичних виробів для мікробіологічного аналізу, навчитися підготовувати проби для визначення мікробіологічної чистоти парфумерно-косметичних виробів, опанувати метод визначення власної антимікробної активності парфумерно-косметичної продукції, методи підготовка проб до аналізу на стерильність.

8.1 Добір проб

Проби парфумерно-косметичних виробів для мікробіологічного аналізу відбирають до добору проб для фізико-хімічних, органолептичних і інших видів випробувань із дотриманням правил асептики, для того щоб виключити вторинне мікробне забруднення продукту.

Від кожної партії парфумерно-косметичних виробів, що підлягають контролю, слід брати не менш трьох одиниць виробів у споживчій тарі (упакуванні), яка не повинна мати слідів ушкоджень.

При випробуваннях на стерильність від кожної партії парфумерно-косметичних виробів, незалежно від її обсягу, відбирають 10 ампул або 10 інших одиниць упакування.

Пробу, відібрану від окремої одиниці впакування, називають разовою. Кількість продукту в разових пробах з кожного одиничного впакування повинне бути однаковим. Разові проби з'єднують, перемішують і становлять середню пробу.

8.2 Підготовка проб для визначення мікробіологічної чистоти

Перед розкриттям упакування місце з'єднання кришки з тарою обробляють 70 % розчином етилового спирту. Першу порцію в кількості приблизно 10 % вмісту впакування відкидають, потім відбирають проби й переносять у стерильну колбу або флакон місткістю 100-200 см³.

Для випробування готують середню пробу не менш 15 г (см³) з трьох одиниць упакування, що й полягає з рівних разових проб. Таку ж кількість упакувань використовують і для повторних випробувань. У випадку, якщо маса (обсяг) парфумерно-косметичного засобу в одиничному впакуванні менш 5 г (см³), уміст досліджують повністю або використовують більшу кількість упакувань.

5,0 г (см³) або 10,0 г (см³) середньої проби відбирають за умови повної стерильності й поміщають у скляні колби або флакони, що містять відповідно 45 см³ або 90 см³ 1%-го розчину твіну-80 у фізіологічному розчині (див. додаток). Суміш ретельно перемішують протягом 15-30 хвилин до повної гомогенізації (або поміщають на апарат для струшування). При

необхідності проби прогрівають на водяній лазні або в термостаті до 40-45 °С, але не більш 10 хв. Для гомогенізації продукції, яка погано розчиняється у воді, використовують скляне намисто.

Емульсії типу вода-масло підготовляють аналогічним способом, використовуючи 4%-й розчин твіну-80 у фізіологічному розчині і попередньо (до струшування) прогріваючи на водяній лазні або в термостаті до 40-45 °С протягом 20 хв.

Одержують суміш, в 10 г (см³) якої міститься 1 г (см³) парфумерно-косметичного засобу – перше розведення 1:10. При необхідності роблять наступні десятикратні розведення 2 – 1:100, 3 – 1:1000.

Отримані розведення використовують для посівів. Час із моменту закінчення підготовки проби до початку висіву не повинне перевищувати 30 хвилин.

8.3 Визначення власної антимікробної активності парфумерно-косметичної продукції

Метод заснований на придушенні росту тест-штамів мікроорганізмів під дією випробуваного парфумерно-косметичного засобу. У якості тест-штамів використовують *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (або *Bacillus cereus* ATCC 10702), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (або *Pseudomonas aeruginosa* ГИСК 453), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-Р і культуру *Candida albicans* ATCC 885-653.

Визначення власної антимікробної активності проводиться для парфумерно-косметичних засобів, до складу яких входять консерванти й інші речовини, що володіють антимікробною дією.

Власна антимікробна активність визначається однократно для кожної конкретної рецептури парфумерно-косметичного засобу.

Культури *Bacillus subtilis* (*Bacillus cereus*), *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* і *Staphylococcus aureus* вирощують на одній з рідких середовищ (м'ясо-пептонний бульйон із глюкозою або живильний бульйон "МК" із глюкозою) при температурі 37 °С протягом 19±1 год.

Культуру *Candida albicans* вирощують на рідкому середовищі Сабуро при температурі 30 °С протягом 48±3 год.

З кожної вирослої культури готують суспензію мікроорганізмів, додаючи фізіологічний розчин у співвідношенню 1:1000.

У пробірки вносять по 1 см³ першого розведення випробуваної проби парфумерно-косметичного засобу по і додають:

- у пробірку N 1 – 10 см³ буферного розчину і 1 см³ суспензії *Bacillus subtilis* (*Bacillus cereus*);
- у пробірку N 2 – 10 см³ буферного розчину і 1 см³ суспензії *Candida albicans*;
- у пробірку N 3 – 10 см³ середовища для вирощування бактерій сем. *Enterobacteriaceae* або середовища Мак-Конки і 1 см³ суспензії *Escherichia coli*;

- у пробірку N 4 – 10 см³ однієї з живильних середовищ для вирощування *Pseudomonas aeruginosa* і 1 см³ суспензії *Pseudomonas aeruginosa*;

- у пробірку N 5 – 10 см³ однієї з живильних середовищ для вирощування *Staphylococcus aureus* і 1 см³ суспензії *Staphylococcus aureus*.

Контролем служать пробірки з живильними й середовищами відповідними тест-штамами, у які замість випробуваного парфумерно-косметичного засобу вносять те ж кількість стерильної дистильованої води.

Посіви інкубують при 30±1 °С протягом 48±3 години.

У випадку відсутності росту тест-штамів мікроорганізмів на відповідних живильних середовищах відзначають антимікробну дію випробуваного засобу.

Для усунення антимікробної дії вхідних до складу парфумерно-косметичних засобів консервантів або речовин, що володіють антимікробною дією, середню пробу в кількості 5,0 г (см³) або 10,0 г (см³) за стерильних умов відбирають й поміщають у скляні колби або флакони, що містять відповідно 45 см³ або 90 см³ 4% розчину твіну-80 у фізіологічному розчині, або збільшують розведення випробуваної проби.

8.4 Підготовка проб до аналізу на стерильність

Випробування парфумерно-косметичних засобів на стерильність проводять методом прямого посіву або методом мембранних фільтрів.

Метод мембранних фільтрів не застосовується для суспензій або гомогенатів парфумерно-косметичних засобів, що забруднюють при фільтрації пори фільтрів.

Перед розкриттям ампули з парфумерно-косметичною продукцією обробляються етиловим спиртом. Шийку ампули обережно прогрівається в полум'ї пальника. На добре прогріту шийку ампули капають 1 краплю стерильного фізіологічного розчину. Ампули обережно розкривають по місці тріщини, що утворювався в склі.

Вміст 10 ампул або 10 інших упакувань поєднують у єдину пробу. З об'єднаної проби за умов повної стерильності відбирають 5,0 г (см³) або 10,0 г (см³) парфумерно-косметичного засобу.

При випробуваннях методом прямого посіву відібрані проби безпосередньо засівають у відповідні живильні середовища

При випробуваннях методом мембранних фільтрів відібрані проби поміщають у скляні колби або флакони, що містять відповідно 45 см³ або 90 см³ стерильного 1% розчину твіну-80 у фізіологічному розчині, попередньо пропущеного через мембранний фільтр із розміром пор 0,45±0,02 мкм. Проби ретельно перемішують протягом 15-20 хвилин до повної гомогенізації.

При випробуванні масляних розчинів проби підготовляють аналогічним способом, використовуючи 4% розчин твіну-80 у фізіологічному

розчині й попередньо (до струшування) прогріваючи на водяній лазні або в термостаті до 40-45 °С протягом 20 хвилин.

Контрольні запитання:

1. Яким чином проводять добір проб парфумерно-косметичних виробів для мікробіологічного аналізу?
2. Як проводять підготовку проб для визначення мікробіологічної чистоти?
3. На чому засновано метод визначення власної антимікробної активності парфумерно-косметичної продукції?
4. Яким чином усувають антимікробну дію вхідних до складу парфумерно-косметичних засобів консервантів або речовин, що володіють антимікробною дією?

9. ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №7

ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОЇ КІЛЬКОСТІ МЕЗОФІЛЬНИХ АЕРОБНИХ І ФАКУЛЬТАТИВНО-АНАЕРОБНИХ БАКТЕРІЙ

Ціль роботи: Ознайомитися з методом глибинного посіву та двошаровим агаровим методом для визначення загальної кількості мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних бактерій, опанувати методику обробки результатів.

При мікробіологічному контролі парфумерно-косметичної продукції використовують стандартизовані методи мікробіологічного посіву. Визначають наступні групи мікроорганізмів: мезофільні аеробні й факультативно-анаеробні мікроорганізми; дріжджі, дріжджоподібні й цвілеві гриби; бактерії сімейства Enterobacteriaceae; бактерії виду Staphylococcus aureus; бактерії виду Pseudomonas aeruginosa.

Методи засновані на виявленні й кількісному підрахунку всіх вирослих колоній мікроорганізмів при культивуванні посівів в аеробних умовах при температурі 30 °С протягом 72±3 години у перерахуванні їх кількості на 1 г (см³) досліджуваного продукту.

Для визначення загальної кількості мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних бактерій вибирають ті розведення, при посіві яких на чашках виростає не менш 15 і не більш 300 колоній.

Посів здійснюють глибинним або двошаровим агаровим методами.

9.1 Метод глибинного посіву

По 1 см³ досліджуваного матеріалу з розведень, приготовлених по п. 7.1, висівають паралельно у дві чашки Петри для кожного розведення.

При посіві кришку чашки Петри злегка відкривають і посівний матеріал вносять на дно чашки. Не пізніше ніж через 15 хвилин після внесення матеріалу, його заливають 15-20 см³ одним із середовищ (м'ясо-пептонним агаром із глюкозою або живильним агаром "МК" із глюкозою), попередньо розплавленим й охолодженим до температури 45 °С. Чашки з посівами, залитими живильним середовищем обережно обертають, щоб посівний матеріал рівномірно розподілився по всьому живильному середовищу. Потім чашки з посівами залишають на горизонтальній поверхні до повного застигання живильного середовища.

Після застигання середовища чашки поміщають у термостат нагору дном і витримують при температурі 30 °С протягом 72±3 годин.

9.2 Двошаровий агаровий метод

По 1 см³ досліджуваного матеріалу з розведень, приготовлених по п. 7.1, вносять у кожну із двох пробірок з 4 см³ одного із середовищ (м'ясо-пептонним агаром із глюкозою або живильним агаром "МК" із глюкозою), попередньо розплавленого й охолодженого до температури 45 °С. Швидко перемішують уміст пробірок і переносять у чашки Петрі із застиглим середовищем, розподіляючи його рівномірно по поверхні середовища.

Після застигання середовища чашки поміщають у термостат нагору дном і витримують при температурі 30 °С протягом 72±3 годин.

Перегляд посівів здійснюється щодня.

Результати оцінюються по кожній пробі окремо.

Підраховують кількість колоній на тих чашках, де їх виросло від 15 до 300, підсумують і знаходять середнє арифметичне з них.

Допускається враховувати колонії за допомогою лупи з 5-им збільшенням.

Отримане середнє арифметичне число колоній округляють у такий спосіб:

- якщо число менше 100, то його округляють до найближчого числа, кратного 5;

- якщо число більше 100 і його остання цифра 5, то його округляють до найближчого числа, кратного 20;

- якщо число більше 100 і його остання цифра не 5, то його округляють до найближчого числа, кратного 10.

Кількість мікроорганізмів в 1 г продукту (X) обчислюють за формулою:

$$X = a \cdot 10^N / q,$$

де:

a – округлене середнє арифметичне число колоній;

q – обсяг посівного матеріалу, внесеного в чашку, см³;

N – ступінь десятикратного розведення продукту.

Результати аналізу виражаються числом від 1,0 до 9,9, помноженим N на 10, де N - відповідний ступінь десятикратного розведення продукту.

Якщо на чашках з розведенням 1:10 не виявлене росту бактерій, то результат записують так: менш $1,0 \times 10$ клітин на 1 г (см³).

Якщо на чашках виросло більш 300 колоній, то посіви повторюють, використовуючи більш високі розведення продукту.

Контрольні запитання:

1. Які групи мікроорганізмів визначають при мікробіологічному контролі парфюмерно-косметичної продукції?
2. Які методи використовують при визначення загальної кількості мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних бактерій?
3. У чому полягає сутність методу глибинного посіву для визначення загальної кількості мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних бактерій?
4. У чому полягає сутність двошарового агарового методу для визначення загальної кількості мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних бактерій?
5. Яким чином оцінюють результати, які отримані при дослідженні?

10. ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 8

ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКОСТІ ДРІЖДЖІВ, ДРІЖДЖОПОДІБНИХ І ЦВІЛЕВИХ ГРИБІВ

Ціль роботи: Ознайомитися з методом глибинного посіву та двошаровим агаровим методом для визначення кількості дріжджів, дріжджоподібних і цвілевих грибів, опанувати методику обробки результатів.

Методи засновані на виявленні й кількісному підрахунку всіх вирослих колоній мікроорганізмів, типових по макро- і (або) мікроскопічній морфології, на селективному агаризованому живильному середовищі Сабура, при культивуванні посівів при температурі 30 °С протягом 120 ± 3 годин.

Для визначення кількості дріжджів і цвілевих грибів вибирають ті розведення, при посіві яких на чашках виростає не менш 15 і не більш 150 колоній для дріжджів і не менш 5 і не більш 50 – для плісняви.

Посів здійснюють глибинним або двошаровим агаровим методами.

10.1 Метод глибинного посіву

По 1 см³ досліджуваного матеріалу з розведень, приготовлених по п. 7.1, висівають паралельно у дві чашки Петрі для кожного розведення.

При посіві кришку чашки Петрі злегка відкривають і посівний матеріал вносять на дно чашки. Не пізніше ніж через 15 хвилин. після внесення

матеріалу його заливають 15-20 см³ попередньо розплавленої й охолодженої до температури 45 °С. З агаризованого середовища Сабуро. Чашки з посівами, залитими живильним середовищем, обережно обертають, щоб посівний матеріал рівномірно розподілився по всій живильній. середовищу. Потім чашки з посівами залишають на горизонтальній поверхні до повного застигання живильного середовища.

Після застигання середовища чашки поміщають у термостат нагору дном і інкубують при температурі 30 °С протягом 120±3 годин.

10.2 Двошаровий агаровий метод

По 1 см³ досліджуваного матеріалу з розведень, приготовлених по п. 7.1, вносять у кожну із двох пробірок з 4 см³ попередньо розплавленого й охолодженого до температури 45 °С агаризованого середовища Сабуро. Швидко перемішують уміст пробірок і переносять у чашки Петрі із застиглим агаризованим середовищем Сабуро, розподіляючи його рівномірно по поверхні середовища.

Після застигання середовища чашки поміщають у термостат нагору дном і витримують при температурі 30 °С протягом 120±3 годин.

Результати оцінюються по кожній пробі окремо.

Перегляд посівів здійснюється щодня, попередній облік типових колоній проводять через 72±3 години після витримання посівів у термостаті, а остаточний – через 120±3 годин.

На поверхні щільного середовища ріст і розвиток дріжджів і дріжджоподібних грибів характеризується появою плоских або опуклих колоній білого або кремового, іноді сіро-білого цвіту. У глибині агару дріжджі утворюють сочевицеподібні колонії.

Розвиток цвілевих грибів характеризується появою сметаноподібних, слизових колоній різного фарбування з наступним опушенням.

Підраховують усі вирослі колонії, підсумують і знаходять середнє арифметичне з них.

Допускається враховувати колонії за допомогою лупи з 5-им збільшенням.

Отримане середнє арифметичне число колоній, якщо необхідно, округляють як описано в п. 9.2.

Кількість дріжджів і цвілевих грибів в 1 г (см³) продукту обчислюють за п. 9.2.

Контрольні запитання:

1. На чому засновані методи визначення кількості дріжджів, дріжджоподібних і цвілевих грибів?
2. Яке середовище використовують для визначення кількості дріжджів, дріжджоподібних і цвілевих грибів?
3. Якими методами здійснюють визначення кількості дріжджів, дріжджоподібних і цвілевих грибів?

4. Які колонії характерні для розвитку дріжджів і дріжджоподібних грибів при використанні двошарового методу посіву?

5. Які колонії характерні для розвитку цвілевих грибів при використанні двошарового методу посіву?

11. ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №9

ВІЯВЛЕННЯ Й ІДЕНТИФІКАЦІЯ БАКТЕРІЙ СІМЕЙСТВА ENTEROBACTERIACEAE

Ціль роботи: Ознайомитися з накопичувальними і селективними живильними середовищами для виявленні бактерій сімейства Enterobacteriaceae та біохімічними тестами для подальшої ідентифікації цих бактерій.

До сімейства Enterobacteriaceae відносяться Гр⁻ неспороутворюючі палички, які дають негативну оксидазную реакцію, ферментують глюкозу з утвором кислоти й відновлюють нітрати в нітрити.

Метод заснований на виявленні бактерій сімейства Enterobacteriaceae з використанням накопичувальних і селективних живильних середовищ із подальшою ідентифікацією виявлених бактерій по нижченаведених біохімічних тестах.

10 см³ досліджуваного матеріалу з розведення 10, приготовленого по п. 7.1, вносять у скляний флакон місткістю 200 см³, що містить 100 см³ середовища для вирощування бактерій сем. Enterobacteriaceae або середовища Мак-Конки. Суміш перемішують і інкубують при температурі 37 °С протягом 24-48±3 годин.

При наявності ознак росту на накопичувальних середовищах (помутніння середовища, зміна її цвіту) роблять пересівання петлею на чашки Петрі із середовищем Ендо. Посіви інкубують при температурі 37 °С протягом 24-48±3 години.

На середовищі Ендо бактерії сімейства Enterobacteriaceae утворюють колонії круглі, малинові з металевим блиском або без нього, рожеві, безбарвні, блискучі, опуклі, діаметром 1-4 мм.

При фарбуванні по Граму спостерігаються Гр⁻ неспороутворюючі палички.

При відсутності росту на середовищі Ендо типових для сімейства Enterobacteriaceae колоній вважають, що в зразку немає представників даного сімейства.

Колонії, підозрілі по морфології (кожну окремо), пересівають петлею на одне зі скошених середовищ (м'ясо-пептонний агар із глюкозою або живильний агар "МК" із глюкозою).

Посіви інкубують при 37 °С протягом 24±3 годин. Культури перевіряють на чистоту.

Чисті культури досліджують на наявність ферменту цитохромоксидази, для чого смужку фільтрувального паперу змочують реактивом на виявлення цитохромоксидази і наносять бактеріологічною петлею або скляною паличкою добову чисту культуру досліджуваних бактерій. Синє фарбування, що з'являється через 2-5 хвилин, свідчить про позитивну оксидазну реакцію.

При негативній оксидазній реакції культури пересівають петлею на середовище для визначення ферментації глюкози і в середовище для визначення здатності відновлювати нітрати в нітрити.

У половину пробірок із середовищем для визначення ферментації глюкози вносять по 0,5 см³ стерильного вазелінового масла. Посіви інкубують при 37 °С протягом 24±3 год. При наявності росту ферментацію глюкози встановлюють по зміні кольору середовища із червоного в жовтий у пробірках з маслом і без нього.

При проведенні О/Ф-тесту посів роблять уколом у два стовпчики із середовищем Х'ю-Лейфсена, один з яких заливають 1 см³ стерильного вазелінового масла. Посіви інкубують при 37 °С протягом 24±3 год. При позитивній реакції відбувається зміна кольору середовища при культивуванні як в аеробних, так і в анаеробних умовах.

Про наявність нітритів у середовищі судять по появі червоного фарбування при внесенні в середовище реактиву Грісса. Для чого до добової досліджуваної культури на середовищі для визначення наявності нітритів доливають 0,2-0,3 см³ реактиву Грісса, занурюючи піпетку до дна пробірки. Поява червоного фарбування свідчить про наявність нітритів.

Якщо в досліджуваному зразку виявлені Гр⁻ неспороутворюючі палички, які дають негативну оксидазну реакцію, ферментують глюкозу з утвором кислоти й відновлюють нітрати в нітрити, це значить, що парфумерно-косметичний засіб контаміновано бактеріями сімейства Enterobacteriaceae.

Контроль запитання:

1. Які групи живильних середовищ використовують для виявлення бактерій сімейства Enterobacteriaceae?
2. Наведіть приклади накопичувальних живильних середовищ для виявлення бактерій сімейства Enterobacteriaceae?
3. Яке селективне живильне середовище використовується для виявлення бактерій сімейства Enterobacteriaceae?
4. Які колонії характерні для бактерій сімейства Enterobacteriaceae вирощених на середовищі Ендо?
5. Які біохімічні тести проводять для подальшої ідентифікації цих бактерій?

12. ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №10

ВИЯВЛЕННЯ Й ІДЕНТИФІКАЦІЯ PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Ціль роботи: Ознайомитися з накопичувальними і селективними живильними середовищами для виявленні бактерій виду *Pseudomonas aeruginosa* та біохімічними тестами для подальшої ідентифікації цих бактерій.

Мікроорганізми виду *Pseudomonas aeruginosa* являють собою Гр⁻ неспороутворюючі палички, які дають позитивну оксидазну реакцію, утворюють проникаючий у субстрат пігмент феназинового ряду, що має буруватий відтінок з варіантами від синьо-зеленого (піоціанін) до коричнево-червоного, і здатні до росту при температурі 42 °С.

Метод заснований на виявленні бактерій виду *Pseudomonas aeruginosa* з використанням накопичувальних і селективних живильних середовищ із подальшою ідентифікацією виявлених бактерій по нижченаведених біохімічних тестах.

10 см³ досліджуваного матеріалу з розведення 10, приготовленого по п. 7.1, вносять у скляний флакон місткістю 200 см³, що містить 100 см³ одного з живильних середовищ (м'ясо-пептонний бульйон із глюкозою, живильний бульйон "МК" із глюкозою, середовище для вирощування *P. aeruginosa*). Суміш перемішують і інкубують при температурі 37 °С протягом 24-48±3 год.

При наявності ознак росту в накопичувальному середовищі роблять пересівання петлею на чашки з одного з живильного середовища (м'ясо-пептонний агар із глюкозою або живильний агар "МК" із глюкозою).

Посіви інкубують при температурі 37 °С протягом 24-48±3 год.

При наявності росту зеленуватих, флюоресцуючих колоній, що володіють характерним запахом й офарблюють середовище, з них роблять мазки й офарблюють по Граму.

Колонії, підозрілі по морфології (кожну окремо), пересівають петлею на одну зі скошених середовищ (м'ясо-пептонний агар із глюкозою або живильний агар "МК" із глюкозою). Посіви інкубують при 37±1 °С протягом 24±3 год. Культури перевіряють на чистоту.

Чисті культури колоній досліджують на наявність цитохромоксидази. Для чого смужку фільтрувального паперу змочують реактивом на виявлення цитохромоксидази і наносять бактеріологічною петлею або скляною паличкою добову чисту культуру досліджуваних бактерій. Синє фарбування, що з'являється через 2-5 хвилин, свідчить про позитивну оксидазну реакцію.

Оксидазопозитивні колонії пересівають петлею на середовище А і інкубують при температурі 37 °С протягом 24-48±3 год.

На середовищі А культура *Pseudomonas aeruginosa* утворює пігмент феназинового ряду, що має буруватий відтінок з варіантами від синьо-зеленого (піоціанін) до коричнево-червоного й проникаючий у субстрат.

Для додаткового підтвердження приналежності до виду *Pseudomonas aeruginosa* чашки із середовищем А інкубують при температурі 42 °С протягом 24±3 год.

Культура *Pseudomonas aeruginosa* росте у вищевказаних умовах з утвором синьо-зеленого пігменту.

Якщо в результаті досліджень виявлені колонії Гр⁻ неспороутворюючих паличок, що дають позитивну оксидазну реакцію, що утворюють пігмент або без нього, що й дають ріст при 42 °С, вважають, що парфумерно-косметичний засіб контаміновано *Pseudomonas aeruginosa*.

Контроль запитання:

1. Які групи живильних середовищ використовують для виявлення бактерій виду *Pseudomonas aeruginosa*?
2. Які колонії характерні для бактерій виду *Pseudomonas aeruginosa*?
3. Які біохімічні тести проводять для подальшої ідентифікації цих бактерій?
4. Які результати досліджень дають підставу вважати, що парфумерно-косметичний засіб контаміновано *Pseudomonas aeruginosa*?

13. ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №11

ВИЯВЛЕННЯ Й ІДЕНТИФІКАЦІЯ STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Ціль роботи: Ознайомитися з накопичувальними і селективними живильними середовищами для виявленні бактерій виду *Staphylococcus aureus* та біохімічними тестами для подальшої ідентифікації цих бактерій.

Мікроорганізми виду *Staphylococcus aureus* являють собою Гр⁺ коки, що володіють лецитиназною активністю, зброджують манніт в аеробні й анаеробних умовах або мальтозу в анаеробних умовах, дають позитивну реакцію плазмокоагуляції.

Метод заснований на виявленні бактерій виду *Staphylococcus aureus* з використанням накопичувальних і селективних живильних середовищ із подальшою ідентифікацією виявлених бактерій по нижченаведених біохімічних тестах.

10 см³ досліджуваного матеріалу з розведення 10, приготовленого по п. 7.1, вносять у скляний флакон місткістю 200 см³, що містить 100 см³ одного з живильних середовищ (сольовий бульйон, жовтково-сольовий агар). Суміш перемішують і інкубують при температурі 37 °С протягом 24-48±3 годин.

При наявності ознак росту роблять пересівання петлею на чашки з одним із середовищ: жовтково-сольовий агар або Байрд-Паркер агар, або маннітно-сольовий агар. Посіви на жовтково-сольовий і Байрд-Паркер агар інкубують при температурі 37 °С протягом 48±3 год, а посіви на маннітно-сольовий агар – протягом 24-48±3 год.

При рості на жовтково-сольовому агарі *Staphylococcus aureus* утворює круглі колонії, що злегка піднімаються над поверхнею агару, діаметром 2-2,5 мм з рівними краями, пофарбовані в жовтий, золотавий, кремовий, палевий або білий цвіт, оточені зоною лецитиназної активності.

На середовищі Байрд-Паркер *Staphylococcus aureus* росте у вигляді чорних блискучих колоній діаметром 1-1,5 мм, оточених зоною лецитиназної активності.

Наявність на маннітно-сольовому агарі колоній, оточених жовтими зонами, свідчить про здатність цих мікроорганізмів ферментувати манніт.

З підозрілих по морфології колоній роблять мазки й офарблюють по Граму. Стафілококи по Граму офарблюються позитивно, мають кулясту або близьку до неї форму з діаметром 0,6-1,0 мкм і розташовуються звичайно у вигляді скупчень, що нагадують грону винограду.

При виявленні Gr^+ коків роблять пересівання на одну зі скошених середовищ (м'ясо-пептонний агар із глюкозою або живильний агар "МК" із глюкозою). Посіви інкубують при 37 °С протягом 24±3 год.

Виділену чисту культуру пересівають у середовище Гісса з маннітом або мальтозою, розлиту високим стовпчиком (посів роблять уколом). Інкують при 37 °С протягом 24±3 годин.

У випадку росту стафілококів на середовищі Гісса з манітом або мальтозою спостерігається ферментація або окиснення вуглеводу, що супроводжуються зміною кольору середовища.

Виділену чисту культуру досліджують на наявність ферменту плазмокоагулази.

Для проведення реакції в стерильну пробірку з 0,5-1,0 см³ плазми крові кролика, розведеної в 3-4 рази або приготовленої із сухого препарату промислового виробництва, вносять одну петлю добової агарової культури. Одну пробірку із плазмою крові залишають незасіяною для контролю. Уміст пробірок перемішують і інкують при 37 °С протягом 24±3 год. Результат ураховують через 2, 4, 6 і 24 год.

При відсутності згортання плазми через 24 години досліджувану культуру відносять до коагулазонегативної.

Реакцію вважають позитивною при утворі навіть невеликого згустку.

Якщо в результаті досліджень виявлені колонії Gr^+ коків, що ферментують манніт в аеробних й анаеробних умовах або мальтозу в анаеробних умовах, володіють лецитиназною активністю, дають позитивну реакцію плазмокоагуляції, вважають, що парфумерно-косметичний засіб контаміновано *Staphylococcus aureus*.

Контроль запитання:

1. Які групи живильних середовищ використовують для виявлення бактерій виду *Staphylococcus aureus*?

2. Які колонії характерні для бактерій виду *Staphylococcus aureus* при рості на жовтково-сольовому?

3. Які колонії характерні для бактерій виду *Staphylococcus aureus* при рості на середовищі Байрд-Паркер?
4. Який вигляд мають стафілококи офарблені по Граму?
5. Які біохімічні тести проводять для подальшої ідентифікації для бактерій виду *Staphylococcus aureus*?
6. Яким чином виділену чисту культуру досліджують на наявність ферменту плазмокоагулази?
7. Які результати досліджень дають підставу вважати, що парфумерно-косметичний засіб контаміновано *Pseudomonas aeruginosa*?

14. ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №12

ВИПРОБУВАННЯ НА СТЕРИЛЬНІСТЬ

Ціль роботи: Ознайомитися з методами визначення стерильності парфумерно-косметичних засобів.

14.1 Метод прямого посіву

Метод заснований на здатності основної більшості як аеробних, так і анаеробних бактерій давати видимий ріст на тіогліколовому середовищі, а дріжджів, дріжджоподібних і цвілевих грибів – на середовищі Сабуро.

З об'єднаної проби, приготовленої по п. 8.2, відбирають стерильно по 5,0 г (см³) або 10,0 г (см³) випробуваного засобу й висівають у два скляні флакони (паралельні визначення) місткістю 100 або 200 см³, що містять 50 або 100 см³ рідкого середовища Сабуро і 50 або 100 см³ тіогліколового середовища.

Посіви в середовищі Сабуро інкубують при температурі 30 °С, а посіви в тіогліколовому середовищі при температурі 30-35 °С протягом 14 діб. Посіви переглядають щодня.

14.2 Метод мембранних фільтрів

Метод мембранних фільтрів заснований на фільтрації розчинів через мембранні фільтри з розміром пор не більш 0,45±0,02 мкм, на яких уловлюється основна кількість мікроорганізмів, з наступним культивуванням їх у тіогліколовому середовищі й у рідкому середовищі Сабуро.

Фільтрування проводять у стерильних умовах з використанням фільтраційної установки, що включає фільтроутримувач, з'єднаний з колбою приймачем. Фільтроутримувач складається з лійки із кришкою й підстави з пористої пластини, на яку міститься мембранний фільтр.

Фільтраційну установку стерилізують будь-яким способом, що забезпечують схоронність робочих характеристик мембран, а також стерильність мембран і всієї установки.

Для фільтрації використовують нітратцелюлозні мембранні фільтри з розміром пор $0,45 \pm 0,02$ мкм, діаметром близько 47 мм (мембрана "Владипор" типу МФАС-Б5 або МФА-МА-N5 або інші, що задовольняють вимогам).

Фільтрування проводять під вакуумом 93,3 кПа (70 мм рт. ст.).

Для фільтрування продуктів, що містять невелику кількість зважених часток, використовують попередню фільтрацію через префільтр. У якості префільтрів можна використовувати фільтри типу AP 15 (Millipore), картон для попередньої фільтрації марки КФБЖ, картон для попередньої фільтрації марки КФМП і інші матеріали, здатні ефективно затримувати тверді частки. Пробу, підготовлену по п. 8,2 негайно фільтрують. Фільтрацію закінчують у момент зникнення вологи на поверхні фільтра. Після закінчення фільтрації мембрану відмивають 3-5 порціями по 100 см^3 стерильного фізіологічного розчину для повного видалення з поверхні фільтра речовин, що перешкоджають росту мікроорганізмів.

Після відмивання мембрану негайно витягають із фільтроутримувача, розрізають стерильними ножицями навпіл і одну половину поміщають у скляний флакон місткістю 100 або 200 см^3 , що містить 50 або 100 см^3 рідкого середовища Сабуро, а другу половину – у скляний флакон, що містить 50 або 100 см^3 тіогліколевого середовища.

Посіви в середовищі Сабуро інкубують при температурі 30°C , а посіви в тіогліколовому середовищі – при температурі $30\text{-}35^\circ\text{C}$ протягом 7 діб.

Посіви переглядають у розсіяному світлі щодня й по закінченню періоду інкубації. Наявність росту мікроорганізмів у живильних середовищах оцінюють візуально по появі мутності плівки, осаду й інших макроскопічних змін. Виявлені мікроорганізми підтверджують мікроскопуванням.

Випробувана продукція вважається стерильною при відсутності росту мікроорганізмів. При виявленні росту хоча б в одному флаконі його підтверджують мікроскопуванням і повторюють випробування на такому ж кількості зразків, як і в перший раз. У випадку росту при повторному випробуванні мікроорганізмів, морфологічно подібних з мікроорганізмами, виявленими при первинному посіві, випробувану продукцію вважають нестерильною. Якщо при повторному посіві спостерігається ріст мікроорганізмів, що відрізняються по морфології від спочатку виділених, випробування проводять втретє на подвоєній кількості зразків. При наявності росту хоча б в одному флаконі при третьому випробуванні косметичну продукцію вважають нестерильною.

Контрольні запитання:

1. Якими методами визначають стерильність косметичних засобів?
2. На чому засновано метод прямого посіву для визначення стерильності парфумерно-косметичних засобів?
3. У чому полягає метод мембранних фільтрів для визначення стерильності парфумерно-косметичних засобів?
4. За яких умов продукція вважається нестерильною?

ДОДАТОК

ГОТУВАННЯ РОЗЧИНІВ РЕАКТИВІВ І ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ

Для приготування розчинів реактивів і живильних середовищ використовують дистильовану воду, якщо немає спеціальних вказівок, і реактиви кваліфікації "х.ч." або "ч.д.а."

Необхідне значення рН розчинів і живильних середовищ установлюють за допомогою розчину гідроокису натрію, розчин концентрації NaOH 0,1 моль/дм³ або розчину соляної кислоти, розчин концентрації HCl 0,1 моль/дм³.

Значення рН розчинів визначають методом потенціометрії при температурі 20±2 °С.

Орієнтовне визначення рН розчинів і живильних середовищ допускається проводити за допомогою індикаторного паперу.

Ізотонічний 0,85%-ий розчин хлористого натрію (фізіологічний розчин)

0,85 г хлористого натрію розчиняють в 100 см³ дистильованої води й стерилізують при температурі 121 °С протягом 15 хв.

Зберігають при кімнатній температурі не більш 14 діб.

Розчин твіну-80

1,0 г або 4,0 г твіну-80 розчиняють відповідно в 99 см³ або в 96 см³ фізіологічного розчину, фільтрують через ватно-марлевий фільтр і стерилізують при температурі 121 °С протягом 15 хв.

Зберігають при кімнатній температурі не більш 14 діб.

Розчин фенолового червоного масовою концентрацією 1 %

1,0 г фенолового червоного розтирають у ступці, додаючи невеликими порціями 28,2 см³ розчину натрію гідроокису масовою концентрацією 0,01 моль/дм³. Розчин переносять у мірну колбу місткістю 100 см³ і доводять водою до мітки.

Зберігають у флаконі з темного скла при температурі 4-10 °С.

Розчин малахітового зеленого масовою концентрацією 0,5%

0,5 г малахітового зеленого поміщають у стерильний флакон, заливають 100 см³ гарячої дистильованої води й поміщають на добу в термостат з температурою 37 °С, періодично перемішуючи.

Зберігають у флаконі з темного скла при температурі 4-10 °С.

Реактив Грісса

Розчин N 1: 0,5 г сульфанілової кислоти розчиняють в 30 см³ оцтової крижаної кислоти, додають 100 см³ води, фільтрують через паперовий фільтр. Розчин придатний протягом місяця.

Розчин N 2: 0,1 г 1-нафтиламіну розчиняють в 100 см³ киплячої води, прохолоджують, додають 30 см³ кислоти оцтової крижаної, фільтрують через паперовий фільтр. Розчин придатний протягом 7 діб.

Перед використанням змішують рівні об'єми розчинів N 1 і N 2.

Реактив для визначення наявності ферменту цитохромоксидази

Розчин N 1: 1,0 г 1-нафтолу розчиняють в 100 см³ спирту етилового.

Розчин N 2: 1,0 г N, N-діметил-n-Фенілендіаміну дигідрохлориду розчиняють в 100 см³ дистильованої води.

Перед використанням змішують розчини N 1 і N 2 у співвідношенні 2:3.

Зберігають у флаконах нейтрального світлозахисного скла при температурі 4-10 °С протягом 14 діб.

Середовища для культивування аеробних і факультативно-анаеробних бактерій

М'ясо-пептонний агар із глюкозою

Пептон	10,0 г
Натрію хлорид	1000 см ³
М'ясна вода	5,0 г
Глюкоза	1,0 г
Агар мікробіологічний	13,0 г

Усі інгредієнти розчиняють у м'ясній воді, додають замочений заздалегідь агар, нагрівають до повного його розплавлювання, установлюють рН 7,3, фільтрують через ватно-марлевий фільтр, розливають у флакони й стерилізують при температурі 121 °С протягом 15 хв. Зберігають при температурі 4-10 °С.

Живильний агар "МК" із глюкозою

Бактофок-мк	20,0 г
Натрію хлорид	5,0 г
Глюкоза	1,0 г
Агар мікробіологічний	13,0 г
Вода дистильована	1000 см ³

Усі інгредієнти розчиняють у воді, додають замочений заздалегідь агар, нагрівають до повного його розплавлювання, установлюють рН 7,3, фільтрують через ватно-марлевий фільтр, розливають у флакони й стерилізують при температурі 121 °С протягом 15 хв. Зберігають при температурі 4-10 °С.

Середовища для культивування дріжджів і мікроскопічних грибів

Синтетичне середовище Рідер для дріжджів

Сульфат амонію	3 г
Сульфат магнію	0,7 г
Нітрат кальцію	0,04 г
Хлорид натрію	0,5 г
Фосфорнокислий калій однозаміщений	1,0 г
Фосфорнокислий калій двозаміщений	0,1

Початкове значення рН середовища 6,6. Для вивчення розмноження дріжджів додають 2% цукру, для дослідження бродіння 5-10 %. Повне синтетичне середовище містить також вітаміни (у мкг/мл): інозит 5, біотин 0,0001, пантотенову кислоту 0,25, тіамін 1,0, піридоксин 0,25, нікотинову кислоту 0,5. Стерилізують середовище в автоклаві при 0,1 Мпа.

Картопляно-глюкозний агар

Очищену й нарізану скибочками картоплю масою 200 г заливають 1 л дистильованої води й кип'ятять протягом 1 години. Відвар фільтрують, до фільтрату додають воду до первісного об'єму, 2 % глюкози й 2-3 % агар-агару. Середовище розливають у пробірки або колби й стерилізують при 0,1 Мпа протягом 10 хв. При вживанні встановлюють рН 3,5 за допомогою 10%-го стерильного розчину безводної лимонної кислоти.

Синтетичне середовище Чапека для грибів

Сахароза або глюкоза	30 г
Дигідрофосфат калію	1,0 г
Нітрат натрію	2,0 г
Сульфат магнію	0,5 г
Хлорид калію	0,05 г
Сульфат заліза	0,1 г
Агар мікробіологічний	20 г

Навішення агару вилужують і додають до зазначених інгредієнтів, попередньо розчинених в 1 л дистильованої води, прогрівають текучою парою, установлюють рН 4,0-5,5 10 %-м розчином лимонної кислоти або гідроксиду натрію. Фільтрують, розливають у пробірки й стерилізують дрібно текучою парою 3 доби по 30 хв.

Повне середовище з лізином для виявлення недосконалих дріжджів

Глюкоза	50 г
Сульфат магнію	1 г
Дигідрофосфат калію	2 г
Лактат калію	12 см ³ 50% розчину
L(+) моногідрат лізину	1 г
Агар мікробіологічний	20 г
Вітамінний розчин на 100 см ³ стерильної дистильованої води	
Інозитол	2 г
Пантотенат кальцію	0,4 г
Нікотинамід	0,5 г
Хлоргідраттіамин	0,1 г

Усі інгредієнти розчиняють у 1 дм³ водопровідної води, вносять вітамінний розчин, установлюють рН середовища 5,0-5,2. Середовище розливають у пробірки й стерилізують при температурі 121 °С 15 хв при 0,1 Мпа. Зберігають при температурі 4-10 °С.

Середовище з ацетатом для виявлення недосконалих дріжджів

Ацетат натрію	10 г
Хлорид амонію	10 г
Глюкоза	5 г
Дріжджовий автолізат	3 см ³

Усі інгредієнти розчиняють у воді, розливають у пробірки й стерилізують при температурі 121 °С протягом 30 хв при 0,05 Мпа. Зберігають при температурі 4-10 °С.

Середовище для вирощування грибів (середовище Сабуро)

Пептон або Бактофок-Мк	10,0 г
Глюкоза або мальтоза	40,0 г
Агар мікробіологічний	13,0 г
Вода дистильована	1000 см ³

Усі інгредієнти розчиняють у воді, нагрівають до повного розчинення всіх компонентів, установлюють рН 5,8, фільтрують через ватно-марлевий фільтр, розливають у флакони й стерилізують при температурі 121 °С протягом 15 хв. Зберігають при температурі 4-10 °С.

Середовище Сабуро рідке

Пептон або Бактофок-Мк	10,0 г
Глюкоза або мальтоза	40,0 г
Вода дистильована	1000 см ³

Усі інгредієнти розчиняють у воді, нагрівають до повного розчинення всіх компонентів, установлюють рН 5,8, фільтрують через ватно-марлевий фільтр, розливають у флакони й стерилізують при температурі 121 °С протягом 15 хв. Зберігають при температурі 4-10 °С не більш 14 діб.

Середовища збагачення для бактерій сем. Enterobacteriaceae

Середовище для вирощування бактерій сем. Enterobacteriaceae

Пептон або Бактофок-Мк	20,0 г
Глюкоза	10,0 г
Натрію фосфат двузаміщений	7,5 г
Калію фосфат однозаміщений	2,5 г
Феноловий червоний	0,08 г
Малахітовий зелений	0,015 г
Вода дистильована	1000 см ³

Живильну основу й солі розчиняють у дистильованій воді при нагріванні, вносять глюкозу, додають 8 см³ 1%-го розчину фенолового червоного й 3 см³ 0,5%-го малахітового зеленого, установлюють рН 7,5, нагрівають до повного розчинення компонентів, фільтрують через ватно-марлевий фільтр. Стерилізують при температурі 121 °С протягом 15 хв. Зберігають при температурі 4-10 °С не більш 14 діб.

Середовище Мак-Конки

Пептон або Бактофок-Мк	20,0 г
Лактоза	10,0 г
Жовч суха	5,0 г
Бромкрезоловий пурпурний	0,01 г
Вода дистильована	1000 см ³

Усі інгредієнти розчиняють у воді, нагрівають до повного розчинення компонентів, установлюють рН 7,5, фільтрують через ватно-марлевий фільтр, розливають у флакони й стерилізують при температурі 121 °С протягом 15 хв. Зберігають при температурі 4-10 °С не більш 14 діб.

Живильні середовища для ідентифікації бактерій сім. Enterobacteriaceae

Агар Ендо

Середовище готують, як зазначено на етикетці або по наступному пропису.

До 100 см³ живильного агару, дотримуючи правила асептики, додають замість глюкози 1 г лактози, розчиненої в 5 см³ стерильної води, і підігрівають на киплячій водяній лазні протягом 5 хвилин.

В окрему пробірку наливають 1,0 см³ насиченого спиртового розчину фуксину основного, до якого додають свіжоприготовлений водяний розчин натрію сірчистокиислої масовою концентрацією 10 % до знебарвлення фуксину (блідорозовий колір). Отриману суміш додають у розплавлений лактозний агар, перемішують, уникаючи вспінювання, і розливають у чашки Петрі. Зберігають при температурі 4-10 °С не більш 5 діб.

Середовище для визначення ферментації глюкози

Пептон або Бактофок-Мк	10,0 г
Глюкоза	40,0 г
Натрію хлорид	5,0 г
Феноловий червоний	0,08 г
Вода дистильована	1000 см ³

Живильну основу й натрію хлорид розчиняють у дистильованій воді при нагріванні, вносять глюкозу, додають 8 см³ 1%-го розчину фенолового червоного, установлюють рН 7,4, кип'ятять 1 хв., фільтрують і розливають у пробірки з поплавцями по 4-5 см³. Стерилізують при температурі 121 °С протягом 15 хв. Потім якнайшвидше прохолоджують середовище. Зберігають при температурі 4-10 °С не більш 14 діб.

Середовище для визначення відновлення нітратів у нітрити

Пептон або Бактофок-Мк	5,0 г
Натрію хлорид	5,0 г
Калію нітрат	1,5 г
Вода дистильована	1000 см ³

Усі інгредієнти розчиняють у воді при нагріванні, установлюють рН 7,4, кип'ятять 1 хв., фільтрують через паперовий фільтр і розливають у пробірки по 4-5 см³. Стерилізують при температурі 121 °С протягом 15 хв. Зберігають при температурі 4-10 °С не більш 14 діб.

Середовище Х'ю-Лейфсена

Пептон або Бактофок-Мк	2,0 г
Глюкоза	10,0 г
Натрію хлорид	5,0 г
Калій фосфорнокислий двузаміщений	0,3 г
Бромтимоловий синій	0,03 г
Агар мікробіологічний	3,0 г
Вода дистильована	1000 см ³

Інгредієнти розчиняють у воді, додають заздалегідь замочений агар, нагрівають до повного розчинення всіх компонентів, кип'ячать 2-3 хв., встановлюють рН 7,4, додають 3 см³ 1%-го водяного розчину бромтимолового синього. Середовище фільтрують через ватно-марлевий фільтр, розливають у пробірки по 10-15 см³ і стерилізують при температурі 112 °С протягом 15 хв. Колір середовища до автоклавування – синій, після – трав'янисто-зелений. Зберігають при температурі 4-10 °С не більш 14 діб.

Середовища для вирощування *Pseudomonas aeruginosa*

М'ясо-пептонний бульйон із глюкозою

Пептон	10,0 г
М'ясна вода	1000 см ³
Натрію хлорид	5,0 г
Глюкоза	1,0 г

Усі інгредієнти розчиняють у м'ясній воді, нагрівають до повного розчинення всіх компонентів, встановлюють рН 7,3, фільтрують через ватно-марлевий фільтр, розливають у флакони й стерилізують при температурі 121 °С протягом 15 хв. Зберігають при температурі 4-10 °С.

6.4.11.2. Живильний бульйон "МК" із глюкозою

Бактофок-Мк	10,0 г
Натрію хлорид	5,0 г
Глюкоза	1,0 г
Вода дистильована	1000 см ³

Усі інгредієнти розчиняють у воді, нагрівають до повного розчинення компонентів, встановлюють рН 7,3, фільтрують через ватно-марлевий фільтр, розливають у флакони й стерилізують при температурі 121 °С протягом 15 хв. Зберігають при температурі 4-10 °С.

Середовище для вирощування *P. Aeruginosa*

Пептон або Бактофок-Мк	10,0 г
Глюкоза	2,5 г
Натрію хлорид	5,0 г
Калій фосфорнокислий двузаміщений	2,5 г
Вода дистильована	1000 см ³

Живильну основу й натрію хлорид розчиняють у дистильованій воді при нагріванні, вносять глюкозу, установлюють рН 7,3, кип'ятять 1 хв., фільтрують через паперовий фільтр і стерилізують при температурі 121 °С протягом 15 хв. Зберігають при температурі 4-10 °С не більш 14 діб.

Середовище для виявлення пігменту піоціаніну (Середовище А)

Пептон або Бактофок-Мк	20,0 г
Магнію хлорид безводний	5,0 г
Калію сульфат безводний	1,0 г
Гліцерин	10,0 см ³
Агар мікробіологічний	13,0 г
Вода дистильована	1000 см ³

Усі інгредієнти, крім гліцерину, розчиняють у воді й залишають на 15 хв. Потім вносять гліцерин, ретельно перемішують, розчиняють при нагріванні, установлюють рН 7,4, кип'ятять 1 хв., додають замочений заздалегідь агар, нагрівають до повного його розплавлення, фільтрують через ватно-марлевий фільтр. Стерилізують при температурі 121 °С протягом 15 хв. Зберігають при температурі 4-10 °С не більш 14 діб.

Середовища для вирощування та ідентифікації *Staphylococcus aureus*

Сольовий бульйон

В 1000 см³ м'ясо-пептонного бульйону або живильного бульйону "МК" вносять 65,0 г натрію хлористого, перемішують до повного розчинення солі, розливають у флакони й стерилізують при температурі 121 °С протягом 15 хв. Зберігають при температурі 4-10 °С не більш 14 діб.

Жовтково-сольовий агар

Емульсія яєчно-жовткова: куряче яйце протирають ватою, змоченої етиловим спиртом, поміщають у стерильну чашку Петри, стерильним інструментом пробивають із протилежних сторін яйця два отвори. Через один отвір повністю видаляють білок, потім, побільшавши отвір, виливають жовток у стерильну колбу з 50 см³ фізіологічного розчину, зміст струшують до одержання однорідної маси. Зберігають при температурі 4-10 °С.

У 100 см³ 6 %-го сольового агару, розплавленого до 45-50 °С, вносять 9,5 г натрію хлористого й 10 см³ яєчно-жовткової емульсії. Суміш перемішують до повної гомогенізації компонентів і розливають у чашки Петрі. Зберігають при температурі 4-10 °С не більш 5 діб.

Агар Байрд-Паркер

Основа середовища. В 1000 см³ одного з живильних середовищ, (м'ясо-пептонний бульйон з глюкозою або поживний бульйон «МК» з глюкозою), вносять 17,9 г літію хлористого, 15 г агару мікробіологічного, 5,0 г екстракту дріжджового, перемішують і нагрівають до повного розчинення компонентів. Прохолоджують до 50-60 °С, установлюють рН 6,9, розливають у флакони по 100 см³ і стерилізують при температурі 121 °С протягом 15 хв. Зберігають при температурі 4-10 °С не більш 14 діб.

Перед уживанням до 100 см³ розплавленої й охолодженої до 45-50 °С основи середовища додають 0,5 см³ 2%-го розчину калію телуриду й 5 см³ яєчно-жовткової емульсії. Середовище перемішують до повної гомогенізації компонентів і розливають у чашки Петрі. Перед посівом чашки підсушують у термостаті. Зберігають при температурі 4-10 °С не більш 48 год.

Маннітно-сольовий агар

Пептон або Бактофок-Мк	10,0 г
Натрію хлорид	75,0 г
Маніт	10,0 г
Феноловий червоний	0,025 г
Агар мікробіологічний	13,0 г
Вода дистильована	1000 см ³

Усі компоненти розчиняють у воді, вносять 2,5 см³ 1%-го розчину фенолового червоного, установлюють рН 7,6±0,2, кип'ятять 1 хв., додають замочений заздалегідь агар, нагрівають до повного розплавлення, фільтрують через ватно-марлевий фільтр. Стерилізують під тиском при температурі 121 °С протягом 15 хвилин. Зберігають при температурі 4-10 °С не більш 14 діб.

Середовище Гісса з маннітом або мальтозою

Пептон або Бактофок-Мк	10,0 г
Натрію хлорид	5,0 г
Маніт або мальтоза	10,0 г
Феноловий червоний	0,025 г
Агар мікробіологічний	13,0 г
Вода дистильована	1000 см ³

Усі компоненти розчиняють у воді, вносять 2,5 см³ 1%-го розчину фенолового червоного, установлюють рН 7,6±0,2, кип'ятять 1 хв., додають замочений заздалегідь агар, нагрівають до повного розплавлювання, фільтрують через ватно-марлевий фільтр. Стерилізують під тиском при температурі 121 °С протягом 15 хв. Зберігають при температурі 4-10 °С не більш 14 діб.

Середовище для контролю стерильності (тіогліколеве середовище)

Середовище готують відповідно до вказівок на етикетці або по наступному пропису:

Панкреатичний гідролізат казеїну	15,0 г
Дріжджовий екстракт	5,0 г
Натрію хлорид	2,5 г
Глюкоза	5,0 г
Цистин (цистеїн)	0,75 г
Тіогліолева кислота або тіогліколят натрію	0,5 г
Розчин резазурину натрію (1:1000)	1,0 см ³
Агар мікробіологічний	0,75 г
Вода дистильована	1000 см ³

Усі інгредієнти розчиняють у воді, додають замочений заздалегідь агар, нагрівають до повного розчинення всіх компонентів, установлюють рН 7,2±0,2, фільтрують через ватно-марлевий фільтр, розливають у флакони й стерилізують при температурі 121 °С протягом 15 хв. Зберігають при температурі 10-25 °С у захищеному від світла місці протягом 14 діб.

Буферний розчин

1,0 г пептону ферментативного (або Бактофок-Мк), 4,3 г хлористого натрію, 7,23 г фосфорнокислого двузаміщеного натрію й 3,56 г фосфорнокислого однозаміщеного калію розчиняють при нагріванні в 1000 см³ дистильованої води, фільтрують через паперовий фільтр, установлюють рН 7,0 і розливають у скляні флакони по 400 см³, стерилізують 15 хв. при температурі 121 °С. Зберігають при температурі 4-6 °С не більш 14 діб.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Еремина И.А. Лабораторный практикум по микробиологии / И.А. Еремина, О.В. Кригер. – К., 2005.
2. Методы микробиологического контроля парфюмерно-косметической продукции. Методические указания. МУК 4.2.801-99.
3. СанПиН 1.2.631-97 "Гигиенические требования к производству и безопасности парфюмерно-косметической продукции".
4. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стенли, С. Уилльямса. - М.: Мир. – 1997.
5. Микробиология. Руководство к лабораторным занятиям / под ред. Дикого И.Л. – Х.: Изд-во НФаУ: Золотые страницы, 2002.
6. Клещев Н.Ф. Лабораторный практикум по общей микробиологии. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2000.
7. Методы общей бактериологии: в 3-х томах / под ред. Ф. Герхарда. – М.: Мир, 1983.

Зміст

Вступ.....	3
1. Техніка безпеки проведення лабораторних робіт.....	4
2. Обладнання мікробіологічної лабораторії.....	5
2.1 Приміщення лабораторії й необхідне встаткування.....	5
2.2 Посуд для проведення мікробіологічних досліджень.....	6
2.3 Інвентар.....	6
3. Лабораторна робота №1. Методи фарбування бактерій.....	6
3.1 Фарбування бактерій по методу Грама.....	7
4. Лабораторна робота №2. Живильні середовища.....	8
4.1 Вимоги, які висуваються до живильних середовищ.....	8
4.2 Класифікація живильних середовищ.....	9
4.3 Готування живильних середовищ із сухих середовищ, які випускаються промисловістю.....	12
4.4 Готування живильних із середовищ окремих компонентів.....	12
5. Лабораторна робота №3. Культивування, отримання чистих і накопичувальних культур мікроорганізмів.....	12
5.1 Поняття про чисту та накопичувальну культуру мікроорганізмів..	13
5.2 Методи виділення накопичувальних культур мікроорганізмів.....	14
5.2.1 Методи збагачення.....	14
5.2.1.1 Метод нагрівання.....	14
5.2.1.2 Метод виділення рухливих форм бактерій (метод Шукевича)..	14
5.2.1.3 Методи виділення анаеробних мікроорганізмів.....	14
5.3 Методи виділення чистих культур мікроорганізмів.....	15
5.3.1 Метод Пастера (метод граничних розведень).....	15
5.3.2 Методи механічного поділу мікроорганізмів з використанням щільних живильних середовищ.....	15
5.3.2.1 Метод Коха (метод глибинного посіву).....	15
5.3.2.2 Метод Дригальського.....	16
5.3.2.3 Метод виділення чистих культур за допомогою хімічних речовин.....	16
5.3.2.4 Біологічні методи виділення чистих культур патогенних мікроорганізмів.....	17
6. Лабораторна робота №4. Техніка посіву й пересівання мікроорганізмів на живильні середовища.....	17
6.1 Посів на щільні середовища в чашки Петрі.....	18
6.2 Посів у рідке живильне середовище.....	18
6.3 Пересівання на щільні живильні середовища в пробірках.....	18
7. Лабораторна робота №5. Схема розведення досліджуваного продукту та проведення мікробіологічного дослідження.....	20
7.1 Готування розведень досліджуваного продукту.....	20
7.2 Чашкові методи кількісного обліку мікроорганізмів.....	21
7.3 Методи, які засновані на накопиченні мікроорганізмів з їх	22

наступною ідентифікацією.....	
8. Лабораторна робота №6. Методи відбору й підготовки проб парфумерно-косметичних виробів для мікробіологічного аналізу.....	23
8.1 Добір проб.....	23
8.2 Підготовка проб для визначення мікробіологічної чистоти.....	23
8.3 Визначення власної антимікробної активності парфумерно-косметичної продукції.....	24
8.4 Підготовка проб до аналізу на стерильність.....	25
9. Лабораторна робота №7. Визначення загальної кількості мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних бактерій.....	26
9.1 Метод глибинного посіву.....	26
9.2 Двошаровий агаровий метод.....	27
10. Лабораторна робота №8. Визначення кількості дріжджів, дріжджоподібних і цвілевих грибів.....	28
10.1 Метод глибинного посіву.....	28
10.2 Двошаровий агаровий метод.....	29
11. Лабораторна робота №9. Виявлення й ідентифікація бактерій сімейства Enterobacteriaceae.....	30
12. Лабораторна робота №10. Виявлення й ідентифікація <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32
13. Лабораторна робота №11. Виявлення й ідентифікація <i>Staphylococcus aureus</i>	33
14. Лабораторна робота №12. Випробування на стерильність.....	35
14.1 Метод прямого посіву.....	35
14.2 Метод мембранних фільтрів.....	35
Додаток. Готування розчинів реактивів і живильних середовищ.....	37
Список літератури.....	47

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ Й НАУКИ УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
«Харківський політехнічний інститут»

Навчально-науковий інститут хімічних технологій та інженерії

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

до лабораторних занять з курсу
««Основи мікробіології косметичних засобів»»

для студентів спеціальності
161 «Хімічні технології та інженерія»

Харків
2018

Навчальне видання

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
до лабораторних робіт з курсу
«Основи мікробіології косметичних засобів»
для студентів зі спеціалізації
для студентів спеціальності
161 «Хімічні технології та інженерія»

Українською мовою

Укладачі:

ОВСЯННІКОВА Тетяна Олександрівна
ЖИРНОВА Світлана Вікторівна
БЄЛІНСЬКА Анна Павлівна
АНАН'ЄВА Валерія Вікторівна
ВАРАНКІНА Олександра Олександрівна

Відповідальний за випуск *Л. В. Кричковська*
Роботу до видання рекомендував *Л.В. Кричковська*
В авторській редакції

План 2018, поз.

Підп. до друку 30.08.2018 р. Формат 60 × 84 ¹/₁₆. Ум. друк. арк.3,1.
Обл.-вид. арк. 3,4. Тираж 100 прим. Замовлення. № 47.

Національний науковий центр,
«Харківський фізико-технічний інститут»
61108, м. Харків, вул. Академічна, 1

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК №6187 від 17.05.2018 р.